Aus dem Institut für Geflügelkrankheiten des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

in Kooperation mit dem Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart

Untersuchungen zum Nachweis enteraler Viren in Putenbeständen mittels Transmissionselektronenmikroskopie und Polymerase-Kettenreaktion

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Valerij Akimkin

Tierarzt

aus Orscha/Weißrussland

Berlin 2013

Journal-Nr.: 3603

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Dekan:	UnivProf. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter:	UnivProf. Dr. Hafez Mohamed Hafez
Zweiter Gutachter:	UnivProf. Dr. Nikolaus Osterrieder
Dritter Gutachter:	UnivProf. Dr. Reinhard Fries

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus): Turkey astrovirus, Turkey coronavirus, Rotavirus, turkey diseases, enteritis

Tag der Promotion: 21.06.2013

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek* Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-344-8 **Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2013** Dissertation, Freie Universität Berlin **D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law. No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved © Mensch und Buch Verlag 2013 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	7
2 Literatur	9
2.1 Astroviren	Q
2.1.1 Vorkommen und Bedeutung	۰ م
2.1.2 Morphologie und Klassifizierung	9
2.1.3 Epidemiologie	10
2.1.4 Klinische Symptome	10
2.1.5 Pathologie	10
2.2 Rotaviren	11
2.2.1 Vorkommen und Bedeutung	11
2.2.2 Morphologie und Klassifizierung	11
2.2.3 Epidemiologie	12
2.2.4 Klinische Symptome	12
2.2.5 Pathologie	13
2.3 Coronaviren	13
2.3.1 Vorkommen und Bedeutung	13
2.3.2 Morphologie und Klassifizierung	14
2.3.3 Epidemiologie	14
2.3.4 Klinische Symptome	15
2.3.5 Pathologie	15
2.4 Bakterielle und Parasitäre Enteritiden von Puten	15
2.5 Multikausale Darmerkrankungen der Puten	15
2.6 Virusnachweis	17
2.6.1 Elektronenmikroskopischer Nachweis	17
2.6.1.1 Astroviren	18
2.6.1.2 Rotaviren	18
2.6.1.3 Coronaviren	19
2.6.2 PCR Nachweis	20
2.6.2.1 Astroviren	20
2.6.2.2 Rotaviren	21
2.6.2.3 Coronaviren	21
3 Eigene Untersuchungen	24
3.1 Material und Methoden	24
3 1 1 Puffer und Lösungen	2 .4 24
3.1.2 Untersuchungsplan und Probenahme	<u>2</u> 4 26
3.1.2.1 Auswahl der Betriebe	
3.1.2.2 Probenahme und Probenvorbereitung	
5	

3.1.2.3 Datenerhebung	26
3.1.3 Elektronenmikroskopische Untersuchungen	27
3.1.3.1 Präparation der Grids	28
3.1.3.2 Probenpräparation und Negativkontrastierung	31
3.1.3.3 Elektronenmikroskopie	32
3.1.4 Molekularbiologische Untersuchungen	33
3.1.4.1 Nukleinsäureisolierung	33
3.1.4.2 Polymerase-Kettenreaktion	34
3.1.4.3 Gelelektrophorese und Auswertung der PCR	40
3.1.5 Untersuchungen zum Nachweis von Salmonellen	41
3.1.6 Parasitologische Untersuchungen	42
3.1.7 Berechnung der wirtschaftlichen Parameter	43
3.2 Ergebnisse	44
3.2.1 Elektronenmikroskopische Untersuchungen	44
3.2.1.1 Vergleichende Darstellung der elektronmikroskopischen Virusnachweise ir	ı
allen acht Betrieben	50
3.2.2 Molekularbiologische Untersuchungen	53
3.2.2.1 Virusnachweise in den einzelnen Betrieben	54
3.2.2.2 Vergleichende Darstellung der PCR-Nachweise von Astro-, Rota- und	
Coronaviren in allen acht Betrieben	58
3.2.3 Vergleich der elektronenmikroskopischen und molekularbiologischen	
Erregernachweise	61
3.2.3.1 Sequenzierung von PCR-Produkten	62
3.2.4 Salmonellennachweis	63
3.2.5 Parasitologische Untersuchungen	64
3.2.6 Untersuchungsbegleitende Datenerhebung	66
3.2.6.1 Klinische Erscheinungen bei Tieren	66
3.2.6.2 Wirtschafts- und Haltungsparameter	67
4 Diskussion	. 70
1.1 Beurteilung der elektronenmikroskonischen Befunde	71
4.2 Beurteilung der PCR-Befunde	
4.3 Beurteilung der hakteriologischen und parasitologischen Befunde	70
4.4 Beurteilung der untersuchungsbedeitenden Daten	
4.5 Beurteilung der Leistungsparameter	
4.6 Beurteilung der Methoden	78
4.7 Schlussfolgerungen	
4.8 Ausblick	 80
5 Zusammenfassung	. 81
6 Summary	. 83

7	Literaturverzeichnis	85
8	Anhang	92
8.1	Sequenzervergleich der NSP4-Gensequenzen des Rotavirus	92
8.2	Sequenzervergleich der ORF1b-Gensequenzen des Astrovirus	96

Abkürzungsverzeichnis

EM	Elektronenmikroskopie
IBV	Infektiöses Bronchitis Virus
MSRV-Agar	Modified Semi-Solid Rappaport-Vassiliadis Agar
n.d	nicht durchgeführt
NSP	Nichtstrukturproteinen
ORF	Open Reading Frame/offener Leserahmen
PEC	Poult Enteritis Complex
PEMS	Poult Enteritis and Mortality Syndrome
PES	Poult Enteritis Syndrome
ΡΤΑ	Phosphotungstic acid/Phosphorwolframsäure
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktionen
SRV	Small Round Viruses
TAstV	Turkey Astrovirus
TCoV	Turkey Coronavirus
ТЕМ	Transmissionselektronenmikroskop
UTR	Untranslated Region

1 Einleitung

Viral bedingte Darmerkrankungen sind beim Wirtschaftsgeflügel weit verbreitet. In der Literatur werden zahlreiche Virusarten als Ursache von Darmerkrankungen beschrieben. Sie führen teils monokausal, teils multikausal zum Krankheitsausbruch (Hafez und Jodas, 1997; Saif, 2008). Infektionen finden in der Regel fäkal-oral durch direkten oder indirekten Kontakt zu infizierten Personen oder Tieren statt. Auch kontaminierte Lebensmittel und Wasser sind als Infektionsquellen bekannt. Ca. 40% der Gastroenteritiden bei Menschen werden durch Calici-, Rota-, Adeno- oder Astroviren ausgelöst (Mead et al., 1999). Aufgrund des hohen Infektionsdrucks kann es besonders in Gemeinschaftseinrichtungen wie Schulen, Kindertagesstätten, Alten- und Pflegeheimen sowie Krankenhäusern zu Massenausbrüchen kommen.

Über die Beteiligung von Rota-, Astro- und Coronaviren an Darmerkrankungen bei Puten wurde eine große Anzahl von Untersuchungsergebnissen aus den USA, England und Italien publiziert (Cattoli et al., 2007; Culver et al., 2006a; Jindal et al., 2010). Da das Geflügel in der Tierproduktion zunehmend an Bedeutung gewinnt, wird es immer wichtiger, das Zusammenspiel von Tierhaltungen und der dadurch verursachten Krankheiten, welche der Geflügelwirtschaft massive wirtschaftliche Schäden zufügen können, zu verstehen. Während internationale Forschungsberichte und klinische Studien der letzten Jahre zeigten, dass virale Enteritiden eine größere Gefahr für Nutzgeflügelbestände darstellen, als dies bis jetzt angenommen wurde, liegen für Deutschland bislang keine Untersuchungsergebnisse hierzu vor. Es wird lediglich vermutet, dass Rota-, Astro- und Coronaviren auch in deutschen Putenbeständen weit verbreitet sind.

Ziel dieser Arbeit ist es deshalb, neue Erkenntnisse zum Vorkommen der oben genannten Viren in deutschen Putenbeständen zu erlangen.

Zur Umsetzung dieses Ziels ist es zunächst notwendig, möglichst viele der im Putenkot vorhandenen Viruspartikel zu identifizieren, da nur so geprüft werden kann, ob die aus der Literatur bekannten molekularbiologischen Verfahren die gesuchten Viren auch nachweisen können. Hierfür stellt die elektronenmikroskopische Erregerdiagnostik ein ideales Instrument dar, da es dem Betrachter den sogenannten "offenen Blick" für alle vorhandenen Viruspartikel ermöglicht und somit ein vorzeitiges "Aussortieren" Viruspositiver Proben durch möglicherweise unpassende PCR-Primer verhindert.

Die mit Hilfe des Transmissionselektronenmikroskops identifizierten Viruspartikel können dann mit den in der Literatur beschriebenen molekularbiologischen Verfahren, gegebenenfalls aber auch mit selbst entwickelten PCR-Methoden nachgewiesen werden.

Positive PCR-Produkte aus den verschiedenen Beständen werden anschließend sequenziert, um mit Hilfe von Sequenzvergleichen zum einen die verwandtschaftlichen Verhältnisse der Putenviren untereinander näher zu beleuchten und zum anderen Daten zur Nachweissicherheit der verwendeten PCR-Methoden zu erhalten.

2 Literatur

2.1 Astroviren

2.1.1 Vorkommen und Bedeutung

Astroviren wurden erstmals 1975 in England bei an Durchfall erkrankten Kindern nachgewiesen (Appleton und Higgins, 1975; Madeley und Cosgrove, 1975). Sie gelten als eine der häufigsten Ursachen für virale Durchfallerkrankungen bei Kindern (Modrow et al., 2010a; Murphy et al., 1999a). Nach ihrer Entdeckung wurden sie auch bei verschiedenen Säugetieren (Schweine, Schafe, Rinder, Katzen) und Vögeln (Hühner, Enten, Puten) gefunden. Bei Tieren äußern sich Astrovirusinfektionen durch selbstlimitierende Gastroenteritiden, die oft subklinisch verlaufen (Murphy et al., 1999a). Unter den aviären Astroviren sind das Avian Nephritis Virus (ANV), das Enten Hepatitis Virus Typ 2 und 3 (DAstV-2/3) sowie das Puten Astrovirus 2 (TAstV 2) von Bedeutung. Letzteres gilt als eines der Ursachen für das *Poult Enteritis and Mortality Syndrome* (PEMS), eine Erkrankung der Puten, welche große ökonomische Schäden verursacht. (Hess und Monreal, 2005; Mendez und Arias, 2007; Reynolds und Schulz-Cherry, 2008).

2.1.2 Morphologie und Klassifizierung

Astroviren sind kleine, sphärische, unbehüllte Partikel mit einem Durchmesser von 25 bis 35 nm. Den Namen verdanken die Astroviren ihrem sternförmigen Aussehen bei der Betrachtung im Elektronenmikroskop nach Negativkontrastierung.

Das Virusgenom besteht aus einer nichtsegmentierten einzelsträngigen RNA in Plusstrangorientierung. Das ca. 6800 Basen lange RNA-Molekül besitzt drei offene Leserahmen (Koci und Schultz-Cherry, 2002; Modrow et al., 2010a; Murphy et al., 1999a; Reynolds und Schulz-Cherry, 2008).

Taxonomisch gehören die Astroviren zur Familie der Astroviridae, die in zwei Genera unterteilt wird: *Mamastrovirus* und A*vastrovirus* (Modrow et al., 2010a). Innerhalb dieser Unterfamilien unterscheidet man mehrere tierspezifische Virusgruppen, welche wiederum verschiedene Serotypen beinhalten. Bei den Puten wurden zwei Serotypen nachgewiesen (TAstV-1 und -2) (Koci und Schultz-Cherry, 2002).

2.1.3 Epidemiologie

Astroviren sind weltweit verbreitet und infizieren sowohl Menschen als auch Tiere wie Rind Schwein, Schaf, Hund und Vögel (Koci und Schultz-Cherry, 2002; Less und Kaaden, 2003; Modrow et al., 2010a; Murphy et al., 1999a). Die Infektion erfolgt durch die alimentäre Aufnahme der mit dem Kot in großer Anzahl (bis zu 10¹⁰ Partikel in 1g Kot) ausgeschiedenen Astroviren (Murphy et al., 1999a).

Bei infizierten Jungputen treten die ersten klinischen Symptome zwischen der ersten und dritten Lebenswoche auf. In den meisten Fällen verlaufen die Infektionen mild bis moderat, die Mortalität bleibt dabei in der Regel gering (Reynolds und Schulz-Cherry, 2008).

2.1.4 Klinische Symptome

Nach einer Inkubationszeit von ca. 1 bis 4 Tagen treten die ersten klinischen Symptome auf. Diese äußern sich überwiegend in milden bis mittelschweren Verdauungsstörungen (Murphy et al., 1999a). So zeigten experimentell infizierte Puten schon nach 24 Stunden p.i. Anzeichen einer Darminfektion. Im Vordergrund stehen Durchfälle, die eine Abmagerung der Tiere und Wachstumsstörungen zur Folge haben. Der Kot ist braun-gelb gefärbt und hat eine wässrige bis schaumige Konsistenz. Die am schwersten betroffenen Tiere verweigern die Wasser- und Futteraufnahme, was im weiteren Verlauf der Erkrankung zum Tode führt (Koci et al., 2003; Pantin-Jackwood et al., 2008).

2.1.5 Pathologie

Die pathologisch-anatomischen Veränderungen konzentrieren sich hauptsächlich auf den Verdauungstrakt. Typisch für eine Astrovirusinfektion sind dilatierte Blinddärme, die mit einer gelben, schaumigen Flüssigkeit gefüllt sind. Dünn- und Blinddärme sind bei infizierten Puten im Vergleich zu gesunden Tieren bis zu dreifach vergrößert. (Pantin-Jackwood et al., 2008). Als Ursache dafür vermutet man unverdaute und nicht resorbierte Disaccharide, die das Austreten von Flüssigkeit in den Darm begünstigen (Koci et al., 2003; Reynolds und Schulz-Cherry, 2008).

Die Virusvermehrung findet in den Enterocyten des Dünndarms statt. Infolgedessen werden histologisch Dünndarm-Läsionen und Kryptenhyperplasie beobachtet. Letztere äußert sich in der Zunahme der Kryptentiefe. Die pathohistologischen Veränderungen sind nur geringgradig ausgeprägt, Zellapoptosen sind kaum nachweisbar. (Koci et al., 2003; Pantin-Jackwood et al., 2008; Reynolds und Schulz-Cherry, 2008).

2.2 Rotaviren

2.2.1 Vorkommen und Bedeutung

Rotaviren wurden erstmals 1973 von Bishop et al. beschrieben. Man untersuchte Kinder im Alter zwischen 4 und 31 Monaten die Symptome einer akuten Gastroenteritis zeigten. Die Viruspartikel wurden mittels Elektronenmikroskopie in den Epithelzellen des Dünndarms gefunden. Heute werden Rotavirusinfektionen als Hauptursache für die hohe Sterblichkeit von Neugeborenen und Kleinkindern bei Gastroenteritiden gesehen (Brodt, 2006; Forster und Hammerschmidt, 2007; Parashar et al., 1998).

Auch bei Tieren verursachen Rotaviren eine neonatale Diarrhoe. Diese führt in der Folge oftmals zu einer verminderten Gewichtszunahme mit teilweise hoher Letalität in Problembeständen (Mayr und Kaaden, 2007; Modrow et al., 2010c). Im Jahr 1977 haben Bergland et al. erstmals Rotaviren bei Vögeln nachgewiesen. Der Infektionsverlauf ähnelt dem der Säugetieren beobachtet wird. Auch bei Vögeln stehen Durchfallsymptome wie Exsikkose, Wachstumsdepression und erhöhte Mortalität im Vordergrund (Hafez und Jodas, 1997; McNulty und Reynolds, 2008).

2.2.2 Morphologie und Klassifizierung

Rotaviren bilden ein eigenes Genus Rotavirus in der Virusfamilie der Reoviridae. Weitere bekannte Vertreter dieser Familie sind Orthoreoviren und Orbiviren (Mayr und Kaaden, 2007; Modrow et al., 2010c).

Im Elektronenmikroskop lassen sich die Rotaviren als runde, ca. 70 nm bis 80 nm große unbehüllte Partikel darstellen. Das Viruscore (50 nm) ist mit drei Proteinschichten ummantelt, die ein äußeres (VP7 und VP4) und ein inneres (VP6) Capsid bilden. Auf der Oberfläche der Viruspartikel lassen sich 60 Proteinvorsprünge erkennen (VP4) (Modrow et al., 2010c). Das Genom besteht aus elf doppelsträngigen linearen RNA- Segmenten (Parashar et al., 1998). Jedes Segment codiert für ein Virusprotein. Die einzige Ausnahme bildet das 11. RNA-Segment, welches die Informationen für zwei Virusproteine trägt. Die zwölf Virusproteine setzen sich aus 6 Strukturproteinen (VP1-4, VP6 und VP7) und 6 Nichtstrukturproteinen (NSP1-6) zusammen. (Modrow et al., 2010c)

Basierend auf den antigenetischen Eigenschaften des Capsid-Proteins VP6 werden die Rotaviren in 7 Serogruppen (A bis G) aufgeteilt (McNulty und Reynolds, 2008; Parashar et al., 1998). Rotaviren der Serogruppe A kommen bei Säugetieren und Vögeln vor. Rotaviren der Serogruppen B, C und E nur bei Säugetieren. Zu den Serogruppen D, F und G zählen nur die aviären Rotaviren (McNulty und Reynolds, 2008). Darüber hinaus werden Rotaviren in P (P wie Proteolyse) und G (G wie Glycosylierung) Serotypen unterteilt. Dieser Anordnung liegen die Unterschiede in den äußeren Capsidproteinen VP4 und VP7 zugrunde. Bei den humanen Rotaviren sind 16 G-Serotypen und 27 P-Serotypen bekannt (Modrow et al., 2010c).

Die Segmentierung des RNA-Genoms der Rotaviren ermöglicht einen direkten Austausch der Gensegmente durch das sogenannte "genetic reassortment". Dieses kann bei Doppelinfektionen mit zwei verwandten Rotaviren von statten gehen, wodurch die antigenetischen Eigenschaften des Virus verändert werden können (Modrow et al., 2003).

2.2.3 Epidemiologie

Rotaviren sind die häufigste Ursache für Enteritiden und Durchfälle bei Säugetieren und Menschen (McNulty und Reynolds, 2008).

Rotavirusinfektionen des Geflügels werden bei Huhn, Pute, Ente, Fasan, Perlhuhn und Taube beobachtet. Die Erkrankungen treten überwiegend bei Jungtieren bis zum Alter von 6 Wochen auf (McNulty und Reynolds, 2008).

Rotaviren können auch speziesübergreifend Infektionen hervorrufen (Mori et al., 2002). Beispielweise wurde ein Fall beschrieben, bei dem bei durchfallerkrankten Kälbern Rotaviren isoliert wurden, die mehr mit aviären Rotaviren als mit bekannten bovinen Virusstämmen verwandt waren (Brüssow et al., 1992).

Die Übertragung des Erregers erfolgt horizontal durch orale Aufnahme der mit dem Kot in großer Anzahl ausgeschiedenen Viren (Hafez und Jodas, 1997).

Die Viren vermehren sich in den Epithelzellen des Dünndarms, wodurch es zu einer Zellablösung kommt. Diese Schädigung des Darmepithels führt zu einer Verminderung der Kohlenhydratresorption, wodurch in der Folge osmotische Durchfälle verursacht werden (Brodt, 2006; Modrow et al., 2010c; Yason und Schat, 1986).

2.2.4 Klinische Symptome

Die Inkubationszeit von Rotavirusinfektionen beträgt 1 bis 5 Tage. Infizierte Tiere zeigen Mattigkeit, Inappetenz, ein erhöhtes Wärmebedürfnis sowie eine gesteigerte Aufnahme von Einstreu. (Hafez und Jodas, 1997). Bei einzelnen Tieren wird wässriger Durchfall beobachtet (Yason und Schat, 1986). Durchfallkot kann auch orangefarbenen Schleim enthalten (McNulty und Reynolds, 2008). Morbidität und Mortalität variieren stark (Hafez und Jodas, 1997). Der Schweregrad der Infektion hängt von der Virulenz

der Rotavirusstämme sowie der Interaktion mit anderen enteralen Erregern und Managementfaktoren ab (McNulty und Reynolds, 2008).

2.2.5 Pathologie

Bei der Sektion von rotaviruserkrankten Tieren sind vor allem Veränderungen im Verdauungstrakt zu finden. Dünndarm und Caecum sind mit Gas und gelblich-braunem flüssigem bis schaumigem Inhalt gefüllt. Meist ist eine Dehydratation der Tiere zu beobachten (Hafez und Jodas, 1997; McNulty und Reynolds, 2008; Yason et al., 1987).

Histologisch zeigt sich eine Vakuolisierung und Desquamation der Enterozyten im Dünndarm sowie eine Darmzottenatrophie, Kryptenproliferation und Infiltration der Lamina propria mit heterophilen, eosinophilen und mononukleären Leukozyten (Yason und Schat, 1986).

2.3 Coronaviren

2.3.1 Vorkommen und Bedeutung

In der Veterinärmedizin sind Coronaviren schon seit langem als Krankheitserreger bekannt. Bereits in den dreißiger Jahren des vorherigen Jahrhunderts wurden Coronaviren von Küken isoliert, die an infektiöser Bronchitis erkrankten (Fabricant, 1998). Bei den Säugetieren äußern sich Coronavirusinfektionen überwiegend durch akute Gastroenteritiden. Es können aber auch andere Krankheitsbilder, wie beispielsweise bei der Infektiösen Peritoninitis der Katze, der Encephalomyelitis beim Schwein oder der Hepatitis bei Mäusen (Modrow et al., 2010b; Murphy et al., 1999b; Quiroga et al., 2008) durch diese Viren hervorgerufen werden. Noch bis vor wenigen Jahren spielten Coronaviren beim Menschen nur eine untergeordnete Rolle, da die Infektionen in den meisten Fällen lediglich als milde Erkältungen auftraten (Modrow et al., 2010b). Das änderte sich grundsätzlich, nachdem im Jahr 2003 Coronaviren als Ursache des sogenannten Schweren Akuten Respiratorischen Syndroms (SARS) identifiziert wurden (Drosten et al., 2003).

Bei Puten tritt die Coronavirusinfektion in Form einer schweren Enteritis (auch bekannt als Blaukammkrankheit, Bluecomb Disease) auf. Die Krankheit wurde erstmals 1951 von Peterson und Hymas (Peterson und Hymas, 1951) beschrieben und sorgte in den fünfziger und sechziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts in den USA für hohe wirtschaftliche Verluste (Hafez und Jodas, 1997). Heutzutage wird die Bezeichnung "Bluecomb Disease" nur noch selten verwendet, man spricht allgemein von einer coronaviralen Enteritis der Pute (Cavanagh et al., 2001).

2.3.2 Morphologie und Klassifizierung

Das Coronavirus gehört zur Familie Coronaviridae, zur der außerdem noch die Gattung Torovirus zählt. Die Viruspartikel sind rund (häufig auch pleomorph), behüllt und beinhalten eine einzelsträngige plusstrangorientierte RNA. Komplexiert mit einem nukleinsäurebindenden Protein (N-Protein) bildet diese eine helikal angeordnete Struktur im Inneren des Viruskapsids (Modrow et al., 2010b). Der Partikeldurchmesser beträgt 60-200 nm. Auf der Virushülle befinden sich keulenförmige, ca. 20 nm lange Proteinstrukturen, sogenannte Peplomere, die dem Virus ein Kronen- (= "Corona") ähnliches Aussehen verschaffen (Davies und Macnaughton, 1979; Modrow et al., 2010b; Murphy et al., 1999b).

Aufgrund der serologischen und antigenetischen Eigenschaften werden Coronaviren in drei Gruppen unterteilt: die Gruppen 1 und 2 umfassen humane und Säugetier-Coronaviren, die Gruppe 3 beinhaltet aviäre Coronaviren (IBV und TCoV). Basierend auf den Ergebnissen von Immunoblot- und Immunopräzipitationsanalysen wurden die TCoV zunächst der Gruppe 2 zugeordnet (Dea et al., 1990). Weitere Studien haben aber gezeigt, dass TCoV sehr eng mit dem IB-Virus verwandt sind und somit der Gruppe 3 der aviären Coronaviren angehören (Breslin et al., 1999; Cavanagh et al., 2001; Guy, 2000; Lin et al., 2002).

2.3.3 Epidemiologie

Das Auftreten von coronaviralen Enteritiden wurde bereits in Putenbeständen in den USA, Kanada, Brasilien, Großbritannien, Italien und Frankreich festgestellt (Cavanagh et al., 2001; Culver et al., 2006b; Gomaa et al., 2009; Guy, 2008; Maurel et al., 2009; Moreno et al., 2002; Teixeira et al., 2007). Eine Coronavirusinfektion kann bei Puten aller Altersgruppen auftreten, allerdings sind Jungtiere in den ersten Lebenswochen für diese Viren besonders empfänglich. Die Erregerübertragung erfolgt durch die Aufnahme von Kot infizierter Tiere oder indirekt durch Einstreu, Futter oder Geräte, welche mit Kot kontaminiert sind. Die Infektionsrate in den betroffenen Herden liegt bei 100%. Die Mortalität kann über 20% betragen (Guy, 2008; Hafez und Jodas, 1997). Erkrankte Tiere scheiden die Erreger mit dem Kot aus. Auch mehrere Wochen nach Abklingen der klinischen Symptome können Coronaviren noch in den Kotproben nachgewiesen werden (Guy, 2008).

2.3.4 Klinische Symptome

Die Inkubationszeit beträgt 1 bis 5 Tage. In den meisten Fällen treten die ersten Symptome schon nach 2 bis 3 Tagen auf. Erkrankte Tiere zeigen Mattigkeit, Inappetenz, ein erhöhtes Wärmebedürfnis und haben wässrigen bis schleimigen Durchfall (Guy, 2008; Hafez und Jodas, 1997).

2.3.5 Pathologie

Bei der Untersuchung erkrankter Tiere fallen häufig verschmutzte Federn im Bereich der Kloake auf. Die Därme sind blass, schlaff und mit einem hellgrauen bis bräunlichen Inhalt gefüllt. Vereinzelt findet man auch Blutungen in der Darmschleimhaut. In vielen Fällen kann eine katarrhalische Darmentzündung festgestellt werden. Oft findet man eine Atrophie der Bursa Fabricii vor (Guy, 2008; Hafez und Jodas, 1997). Mikroskopisch werden Läsionen im Darm und in der Bursa Fabricii festgestellt. Die veränderten Epithelzellen erscheinen kubisch und ohne Mikrovilli. Die Basalmembran ist mit mononukleären Zellen infiltriert. Im Darminhalt befinden sich abgelöste Epithelzellen und schleimiges Exsudat (Guy, 2008; Teixeira et al., 2007).

2.4 Bakterielle und Parasitäre Enteritiden von Puten

Ähnlich wie bei den Säugetieren führen auch bei Vögeln zahlreiche bakterielle und parasitäre Infektionen zu Störungen der Verdauung und zur Entwicklung einer Diarrhö. Dabei werden sehr häufig Bakterien wie *E. coli*, Clostridien, *Campylobacter* oder Salmonellen nachgewiesen Bei der parasitologischen Untersuchung der an Durchfall erkrankten Tiere findet man Kokzidien, Histomonaden, Askariden und Heterakiden (Barnes et al., 2000; Hafez und Jodas, 1997).

2.5 Multikausale Darmerkrankungen der Puten

Neben den Darmerkrankungen von Puten, die auf einen einzelnen Erreger zurückzuführen sind, wurden in sehr vielen Fällen auch mehrere Infektionserreger festgestellt, die sich gleichzeitig am Krankheitsgeschehen beteiligen (Abb. 1) (Barnes et al., 2000; Hafez, 2001; Woolcock und Shivaprasad, 2008). Um sowohl die Relevanz einzelner Erreger, als auch deren Wechselwirkungen zu erforschen, wurden zahlreiche Screening-Studien und Infektionsversuche durchgeführt. Als Resultat solcher Studien konnten neue Erkrankungen wie *PEMS (poult enteritis and mortality syndrome)* und *PES (poult enteritis syndrome)* definiert werden. Diese zeichnen sich durch eine Reihe ähnlicher Symptome wie beispielsweise Enteritiden mit wässrigem Durchfall, Wachstumsstörungen und Gewichtverlust aus. Die Mortalität ist dabei in der Regel gering, kann aber unter bestimmten Umständen bis zu 10% steigen (Barnes et al., 2000).

In einer umfassenden Studie an der Universität Minnesota wurden die Ergebnisse der virologischen, bakteriologischen und parasitologischen Untersuchungen von 151 PESassoziierten Putenbeständen analysiert. Dabei wurde festgestellt, dass in etwa 74% der untersuchten Fälle zwei bis sechs Erreger zusammen die Infektion verursachten. Dabei wurden Rotaviren, sogenannte "Small Round Viruses" (SRV), Salmonellen, *E. coli*, Enterokokken und Kokzidien nachgewiesen. Rotaviren oder SRV wurden insgesamt in 51% der Proben gefunden, davon bei 7% als Doppelinfektion (Jindal et al., 2009).

Non - Infectious	Infectious
Feed	Viral agents
Structure	Reo, Astro, Entero, Rota,
Palatability	Coronavirus enteritis, HE,
Energy content	ND, Influenza A
Pellet quality	Bacterial agents
Management	Salmonellas, E. coli,
Available feed space	Clostridia
Available water space	Mycotic agents
Distribution of feeders	Candida
Distribution of waterers	Parasites
Air quality	Coccidia, Histomonas,
Temperature	Hexamitia, Ascaridia
Stocking density	

Abb. 1: Mögliche Ursachen von Darmerkrankungen bei Puten (Hafez, 2001)

2.6 Virusnachweis

2.6.1 Elektronenmikroskopischer Nachweis

Bei der Suche nach Ursachen von Durchfallerkrankungen hat sich die elektronenmikroskopische Untersuchung von Kotproben seit langem als einfach durchzuführende Routinemethode bewährt. Einer der Gründe hierfür liegt darin, dass die Anzahl der ausgeschiedenen Erregerpartikel bei einer virusbedingten Enteritis meist so hoch liegt, dass für den Nachweis im Elektronenmikroskop keine zusätzliche Virusaufkonzentrierung mehr benötigt wird (Doane und Anderson, 1987; Hayat, 2000). Es reicht sogar oftmals aus, lediglich eine geringe Kotmenge mit 1% Ammoniumacetat oder einfach mit destilliertem Wasser zu vermischen und direkt auf das Trägernetz (Grid) aufzutragen. In der Regel beeinträchtigen aber die im Kot enthaltenen Bakterien, Darmzellen, Lipide usw. die Erkennung von Viruspartikeln erheblich (Doane und Anderson, 1987; Hayat, 2000). Um die Belastung durch diese störenden Faktoren zu vermindern, werden die 1:5 bis 1:10 verdünnten Proben zunächst bei relativ niedrigen Drehzahlen (bis zu 3000 x g) zentrifugiert (Fong, 1994). Als Verdünnungspuffer können dabei PBS-Lösung, 1%ge Ammoniumacetat-Lösung, Virus-Transportmedium oder bidestilliertes Wasser verwendet werden. Falls die Konzentration der Viruspartikel in der Probe über 10⁶/ml liegt, kann schon der Überstand der ersten Zentrifugation zum Mikroskopieren verwendet werden (Fong, 1994). Andernfalls können die Viruspartikel durch Ultrazentrifugation bei 15.000 bis 100.000 x g aufkonzentriert werden. (Cattoli et al., 2007; Doane und Anderson, 1987; Jindal et al., 2010; Woolcock und Shivaprasad, 2008). Bei der Ultrazentrifugation besteht allerdings die Gefahr, dass massive Partikelaggregate entstehen, welche den Virusnachweis im Elektronenmikroskop erschweren können (Hayat, 2000).

Eine einfache und effektive Präparationstechnik, um Viruspartikel im Elektronenmikroskop sichtbar zu machen, ist die Negativkontrastierung (Doane und Anderson, 1987). Als Kontrastmittel werden in der Regel 1 bis 2%ige Lösungen der Schwermetallsalze von Molybdän, Wolfram oder Uran verwendet (Bozzola und Russell, 1998). Durch das Anwenden verschiedener Kontrastmittel können unterschiedliche virale Ultrastrukturen abgebildet werden. In den meisten Fällen wird aber Phosphorwolframsäure (PTA) aufgrund deren geringen Toxizität zum Kontrastieren verwendet (Doane und Anderson, 1987).

2.6.1.1 Astroviren

Bei der elektronmikroskopischen Untersuchung von Kotproben lassen sich Astroviren nach Negativkontrastierung als fünf- oder sechsstrahlige sternförmige Partikel erkennen. Dies trifft aber nur auf etwa 10% aller dargestellten Partikel zu, während die restlichen eine glatte Oberfläche aufweisen (Barnes et al., 2000; Koci und Schultz-Cherry, 2002; Madeley und Cosgrove, 1975; Modrow et al., 2010a; Murphy et al., 1999a; Reynolds und Schulz-Cherry, 2008). In einigen Fällen wird dadurch eine Unterscheidung der Astroviruspartikel von anderen enteralen Viren wie z.B. Picorna- und Enteroviren erschwert, so dass solche Partikel oftmals als *Small Round Viruses* (SRV) bezeichnet werden (Koci und Schultz-Cherry, 2002). Die Durchschnittsgröße der Partikel liegt bei 29.6 nm (Reynolds und Schulz-Cherry, 2008). Der Anteil positiver SRV-Befunde bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung von Kot- und Darminhaltproben reicht von etwa 30% (Tang et al., 2005) bis 50% (Cattoli et al., 2007).

2.6.1.2 Rotaviren

Unter dem Elektronenmikroskop zeigen sich Rotaviren als etwa 70 nm große Partikel, die in ihrer Form einem Rad mit kurzen Speichen ähneln (McNulty und Reynolds, 2008). Bei der Identifizierung von Rotaviruspartikeln sollte darauf geachtet werden, dass diese nicht mit Orthoreoviruspartikeln verwechselt werden. Ausschlaggebend hierfür sind Details des äußeren Capsids: bei den Rotaviruspartikeln ist der Rand des äußeren Capsids klarer definiert als bei den Orthoreoviren (McNulty und Reynolds, 2008).

Oft findet man Rotaviruspartikel ohne äußere Proteinschicht. Solche Partikel haben einen gezackten Rand und sind um ca. 10 nm kleiner als Virionen, bei denen alle drei Proteinhüllen (Core-Schale, inneres und äußeres Capsid) vorhanden sind (McNulty und Reynolds, 2008). In den Proben können gleichzeitig beide Virusformen vorkommen, sowohl mit als auch ohne äußeres Capsid. Nicht selten sind auch nur unvollständige Partikel in einer Probe präsent. Eine sichere Differenzierung dieser Virionen von den Orthoreoviren ist aufgrund der rauhen Partikeloberfläche besonders schwierig. Durch von Partikelvermessungen weiß man, dass die Rotaviren etwas kleiner als die Orthoreoviren sind (Madeley und Field, 1988).

Außerdem haben die Spikes, die sich auf der Oberfläche von Rotaviren befinden, eine klar erkennbare Verbindung zum Viruspartikel, während bei den Orthoreoviren diese Verbindung nicht immer deutlich zu sehen ist.

Bei akut verlaufenden Rotavirus-Durchfällen wird eine beträchtliche Menge von Erregern mit dem Kot ausgeschieden. Die Partikelzahl kann bis zu 10^{10} /ml liegen (Palmer und Martin, 1988). In solchen Fällen ist eine Virusaufkonzentrierung nicht erforderlich. Zur Gridpräparation reicht es aus, eine 20%ige Kotsuspension bei niedrigen Umdrehungen (bis 1000 x g) zu klären. Bei wässrigem Durchfall ist hingegen eine Klärung nicht unbedingt notwendig (Fong, 1994; Palmer und Martin, 1988).

In einer retrospektiven Studie in den USA wurden über 1800 Darmproben von Puten elektronmikroskopisch untersucht. Alle beprobten Tiere litten an einer Enteritis. Rotaviren (oder auch rotavirusähnliche Partikel) wurden bei 46% der Proben gefunden (Woolcock und Shivaprasad, 2008). Das Ergebnis einer weiterer Studie an der University Minnesota, in deren Verlauf 43 Proben untersucht wurden, lag mit 58% Rotavirus positiver Proben noch höher (Jindal et al., 2010).

2.6.1.3 Coronaviren

Negativ-kontrastierte Coronaviren weisen im Elektronenmikroskop eine sphärische oder pleomorphe Form auf. Aufgrund der variablen Form reicht die Größe der Partikel von 75 bis 160 nm (Doane und Anderson, 1987). Manche Autoren beschreiben sogar Größendimensionen von 60 bis 220 nm (Madeley und Field, 1988). Die Coronaviruspartikel erkennt man anhand typischer keulenförmiger, ca. 20 nm langer Vorsprünge (sog. Peplomeren), die die Virionen als eine "Krone" umranken und somit namensgebend für diese Viren sind (Doane und Anderson, 1987; Palmer und Martin, 1988). Bei manchen Partikeln sind nicht alle Peplomeren zu sehen, so dass die Partikelober-fläche zum Teil glatt aussieht (Madeley und Field, 1988).

Bei der Identifizierung von Coronaviruspartikeln muss berücksichtigt werden, dass Fragmente der Zellmembranen diesen Viruspartikeln häufig sehr ähnlich sehen. Dies erschwert oftmals die eindeutige Beurteilung elektronenmikroskopischer Präparate. Abhilfe kann in diesen Fällen die Immun-Elektronenmikroskopie bringen. Bei dieser Präparationstechnik ist allerdings ein virusspezifisches Antiserum erforderlich (Guy, 2008).

Bei der Untersuchung von Darm- und Kotproben von Puten mit Enteritiden konnten Tang et al. (2005) bei etwa 30% der Proben Coronavirus-ähnliche Partikel (TCoV-Like) nachweisen. In einer retrospektiven Studie von Woolcock und Shivaprasad (2008) konnten hingegen keine Coronaviren nachgewiesen werden, was auch mit den klinischen Krankheitsverläufen korrelierte. Die für Coronavirusinfektionen charakteristische erhöhte Mortalität wurde ebenfalls nicht beobachtet.

2.6.2 PCR Nachweis

2.6.2.1 Astroviren

Entscheidend für die Entwicklung einer PCR-Methode sind Informationen über den Genomaufbau des Virus sowie die Nukleotidsequenzen der einzelnen Gene. Das komplette Genom des Putenastrovirus wurde bereits im Jahr 2000 sequenziert (Koci et al., 2000b). Durch weitere Analysen wurden drei offene Leserahmen, sogannte ORFs (open reading frame), ermittelt, welche für drei Virusproteine kodieren. ORF1a kodiert für ein Nichtstrukturprotein, ORF1b für eine RNA-abhängige RNA-Polymerase und ORF2 für die Capsidproteine (Koci et al., 2000b). Basierend auf diesen Daten wurden bereits verschiedene PCR-Methoden zum Nachweis von Astroviren entwickelt (Koci et al., 2000a; Tang et al., 2005). Für den sicheren Nachweis von TAstV eines bestimmten Genotyps sind Primer für zwei verschiedene Genomabschnitte notwendig. Ein Primer-Set sollte einen konservierten Bereich des Astrovirus-Genoms amplifizieren, um somit möglichst viele Astrovirusgenotypen nachweisen zu können. Zu diesem Zweck eignet sich am besten das Polymerase-Gen (ORF1b). Diese Region des Astrovirusgenoms ist sowohl für Astroviren von Säugetieren und Vögeln, als auch innerhalb der Vogel-Astroviren hochkonserviert (Koci und Schultz-Cherry, 2002). Ein zweites Primer-Set sollte einen variablen Genomabschnitt, wie beispielsweise ORF2 (Capsid-Gen) amplifizieren und somit einen genotypspezifischen Nachweis ermöglichen (Koci und Schultz-Cherry, 2002; Koci et al., 2000a; Tang et al., 2005). Zwei Primer-Sets dieser Art haben Pantin-Jackwood et al. (2007) in ihrer Studie über enterale Viren bei Puten eingesetzt. In fast 90% der untersuchten Darmproben konnten die Autoren Astroviren mittels PCR nachweisen. Weitere phylogenetische Analysen haben ergeben, dass es sich bei den meisten Astroviren um TAstV-2 handelt. In früheren Untersuchungen konnten die genannten Autoren auch bestätigen, dass ein Vergleich der Sequenzen des Polymerase-Gens verschiedener Isolate eine höhere Homologie aufwies, als dies bei den Sequenzen des Capsid-Gens der Fall war. Durch phylogenetische Analysen von 23 ORF1b-Sequenzen konnten Day et al. (2007) und Pantin-Jackwood et al. (2007) eine Nukleotididentität von 86% bis 99% feststellen. Außerdem ließ sich eine Korrelation zwischen der Probenherkunft und der Grad der Sequenzidentität beobachten. Im Gegensatz dazu waren die Seguenzen des Capsid-Gens zu weniger als 69% identisch und zeigten auch keine geografischen Zusammenhänge (Pantin-Jackwood et al., 2006b). Cattoli et al. (2007) verwendeten in ihrer Studie zum Nachweis von TAstV ebenfalls Sequenzen des Polymerase- und des Capsid-Gens. Dabei wurde das Polymerase-Gen in 76 untersuchten Kot- und Darmproben nachgewiesen, während dies beim Capsid-Gen nur in 41 dieser Proben gelang. Eine Analyse der sequenzierten

Genomabschnitte beider PCRs ergab, dass es sich um TAstV-2 handelte (Cattoli et al., 2007).

Spackman et al. (2005) entwickelten eine Multiplex Real Time RT-PCR zum Nachweis von TAstV, TCoV und Puten Reoviren. Die dabei verwendeten spezifischen Primer für das Polymerase-Gen konnten bereits 1 Tag nach experimenteller Infizierung der Putenküken Astroviren nachweisen. Eine Virusausscheidung wurde sowohl in den Kloakentupfern als auch in den Darmproben bis zum 14. Tag p.i. festgestellt.

2.6.2.2 Rotaviren

Die PCR stellt aufgrund ihrer hohen Sensitivität und der Möglichkeit, den Genotyp von Rotaviren zu ermitteln, eine gute Alternative zum Nachweis mittels Elektronenmikroskopie oder Virusantigen-ELISA dar (Kirkwood, 2010). In der Humanmedizin sind PCR-Methoden etabliert, welche Abschnitte des Gen 4 (VP4), Gen 9 (VP7) oder Gen 9 (NSP4) amplifizieren (Gomara et al., 2000; Gomara et al., 2002; Gouvea et al., 1990; Rodriguez-Diaz et al., 2008). Zum Nachweis aviärer Rotaviren werden Primer für die stark konservierten Bereiche des NSP4-Gens verwendet (Day et al., 2007; Pantin-Jackwood et al., 2007).

Bei Untersuchungen mehrerer Putenmastbetriebe auf enterale Viren mittels PCR wiesen Pantin-Jackwood et al. (2007) bei fast 70% der Proben Rotaviren nach. Die NSP4-Gensequenzen der von diesen Autoren nachgewiesenen Rotaviren waren zu 96,1%-97,5% identisch. Auch Jindal et al. (2010) haben dieselbe PCR für Screening-Untersuchungen in 43 PES-assozierten Putenbetrieben verwendet. Diese Untersuchungen haben ergeben, dass sogar 93% der Bestände Rotavirusinfektionen aufweisen.

2.6.2.3 Coronaviren

Aufgrund der großen genetischen Homologie zwischen dem IB-Virus und dem TCoV (Guy, 2000; Stephensen et al., 1999) basierten die ersten Versuche, den Erreger mit Hilfe der PCR nachzuweisen, auf den genetischen Analysen bereits sequenzierter IB-Virusstämmen (Breslin et al., 1999; Cavanagh et al., 2001). Besonders geeignet für das Design von PCR-Primern ist eine hochkonservierte nichtkodierende Region (3'UTR) am 3'-Ende des RNA-Strangs (Cavanagh, 2005; Jonassen et al., 2005). 3'UTR-Sequenzfragmente zeigen nicht nur hohe Homologien zwischen den Isolaten von Putencoronaviren, sondern auch gegenüber IBV (Cavanagh et al., 2001). Dies erlaubt beispielsweise den Einsatz von IB-Virus (z.B. IBV Vakzinestamm H120) als

Literatur

positive Kontrolle für die 3'UTR-PCR (Culver et al., 2006b; Villarreal et al., 2006). Auch Genomabschnitte, welche für Nukleokapsid- und Matrixproteine kodieren (N- und M-Gen), gelten als hoch konserviert und werden für den Coronavirusnachweis mittels PCR verwendet (Breslin et al., 1999; Cavanagh et al., 2001; Sellers et al., 2004). In mehreren Studien wird der Nachweis von Putencoronaviren mittels PCR beschrieben. Die hohe Sensitivität dieser diagnostischen Methode ermöglicht es, bereits sehr geringe Mengen an Viruspartikeln nachzuweisen. Auf diese Weise kann der Beginn der Virusausscheidung während eines Infektionsversuchs schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt festgestellt werden. So wurde mittels PCR herausgefunden, dass bereits 24 Stunden nach einer oralen Infektion von Putenküken in Kloakentupfern Coronaviren nachweisbar sind (Gomaa et al., 2009; Spackman et al., 2005). Die PCR-Methode wird aber nicht nur für wissenschaftliche Zwecke eingesetzt, sondern auch in der Routinediagnostik, um mit ihrer Hilfe nach den Ursachen von Durchfallerkrankungen zu suchen. Beispielhaft hierfür ist der Einsatz der Coronavirus-PCR bei der Abklärung der Ursachen des sogenannten Poult Enteritis Complex (PEC) in einem brasilianischen Putenbetrieb (Teixeira et al., 2007). Die Tiere der betroffenen Putenfarm zeigten seit ca. zwei Wochen Symptome wie akute Enteritis, Mattigkeit und Kümmern. Daraufhin wurden mehrere Darm- und Kotproben, Kloakentupfer und Teile der Bursa Fabricii bei Puten im Alter zwischen dem dreißigsten und sechzigsten Lebenstag entnommen. Die für die Virusdiagnostik eingesetzte PCR ermöglichte den gleichzeitigen Nachweis von zwei Bereichen des Coronavirusgenoms: Ein 598 bp langer Abschnitt des N-Gens und ein 251 bp langes Fragment der 3'UTR. Durch die Ergebnisse der PCR-Untersuchungen wurde der Verdacht einer Coronavirusinfektion bestätigt. Alle Darmund Kotproben waren Coronavirus-positiv. Die 3'UTR-Primer und die N-Gen-Primer wiesen identische Ergebnisse auf. Während allerdings in den Proben aus der Bursa Fabricii kein Coronavirusgenom nachgewiesen werden konnte, gelang der Nachweis zumindest in 27% der Kloakentupfer. Diese Ergebnisse zeigten, dass für den PCR-Nachweis des Putencoronavirus Kot- und Darmproben am besten geeignet sind (Teixeira et al., 2007).

Auch in Europa hat man sich mit dem Nachweis des Putencoronavirus beschäftigt. Unter dem Einsatz 3'UTR-Primer wurde in Großbritannien eine Prävalenzstudie durchgeführt. Dabei wurde Coronavirus in ca. 20% der untersuchten Betriebe in Verbindung mit Durchfallerkrankungen nachgewiesen (Culver et al., 2006b).

Im Gegensatz hierzu belegen andere Studien, dass viele Mastputenbestände, in denen Durchfallerkrankungen als Problem aufritt, frei von Coronaviren sind. Dies geht aus einer retrospektiven Studie an der Universität von Minnesota (USA) hervor. Die hierbei untersuchten Darminhaltsproben stammten aus 43 Putenbeständen, in denen das *Poult Enteritis Syndrome (PES)* aufgrund klinischer Untersuchungen festgestellt wurde. Die Tiere zeigten Lethargie, Depression und Durchfall. Diagnostisch hatte man sich auf den Nachweis von enteropathogenen Viren konzentriert, darunter auch Coronaviren. In diesem Fall wurden für die PCR für das N-Gen spezifische Primer verwendet. In keiner der Proben konnten jedoch Coronaviren nachgewiesen werden (Jindal et al., 2010).

Auch in einer weiteren Monitoring-Studie aus North-Carolina (USA), in deren Verlauf acht Putenmastbetriebe untersucht wurden, kamen die Autoren zum gleichen Ergebnis. Alle PCR-Untersuchungen, die bei diesem Versuchsansatz das M-Gen des Coronavirus-Genoms detektieren sollten, verliefen negativ (Pantin-Jackwood et al., 2007).

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Material und Methoden

3.1.1 Puffer und Lösungen

Gepuffertes Peptonwasser (als Voranreicherungsmedium)

Pepton	10,0 g
Natriumchlorid	5,0 g
Natriumhydrogenphosphat	3,5 g
Kaliumhydrogenphosphat	1,5 g
Ammoniumeisen(III)-Citrat	6,0 g
Aqua bidest	ad 1000,0 ml
pH-Wert	7,2
Phenolrot-Agar	
Blut-Agar ¹	40,0 g
Agar-Agar ²	5,0 g
Brilliantgrün-Lösung (0,25 %)	2,0 ml
Phenolrot-Lösung (0,2 %)	12,0 ml
Lactose-Monohydrat ³	15,0 g
Aqua bidest	ad 1000,0 ml
pH-Wert	6,9
Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar (XLD-Agar)	
XLD Agar-Basis⁴	55,0 g
Aqua bidest	ad 1000,0 ml
pH	8,4
Modifiziertes halbfestes Rappaport-Vassiliadis Medium (MSRV	/-Agar)
MSRV-Agar Basis⁵	31,6 g
Agar-Agar ²	0,5 g
Novobiocin-Supplement ⁶	10,0 mg
Aqua bidest	ad 1000,0 ml
pH-Wert	5,4

¹ Oxoid, Wesel, Art.-Nr. CM0055

² Difco, Augsburg,. Art.-Nr. 0140

³ Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Art. Nr. 6868

⁴ Bio-Rad, Art.Nr. 356-9124

⁵ Oxoid, Wesel, Art.-Nr. CM0910

⁶ Oxoid, Wesel, Art.-Nr. SR0181

Flotationslösung	
NaCl	1260 g
ZnCl ₂	1320 g
Aqua bidest	4800 ml
PBS-Lösung nach Dulbecco	
NaCl	8 g
KCI	0,2 g
H ₂ PO ₄	0,12 g
$Na_2HPO_4 \ge H_2O$	0,91 g
Aqua bidest	ad 1000 ml
pH-Wert	7,5
Agarosegel (1,5%)	
Agarose ¹	0,75 g
TBE-Puffer (1x)	50 ml
Ethidiumbromid-Stammlösung	
(5 mg Ethidiumbromid ² in 1 ml Aqua	
bidest)	5 µl
TBE-Puffer Stammlösung (10x)	
Tris-Base ³	54 g
Borsäure	27,5 g
EDTA 0,01M	
(0,372g EDTA in 100ml Aqua bidest	
lösen)	40 ml
Aqua bidest	ad 1000 ml
Laufpuffer (TBE-Puffer 1x)	
TBE-Puffer Stammlösung (10x)	100 ml
Aqua bidest	ad 1000 ml
Ladungs-Puffer	
Glycerin	2 ml
EDTA	0,75 g
Ficoll 400 ⁴	0,02 g
Bromphenolblau	5,0 mg
Aqua bidest	ad 10ml

¹ Agarose High Resolution, Carl Roth GmbH, Karlsruhe ,Art.-Nr. K297.2 ² EtBr, Carl Roth GmbH, Karlsruhe Best.-Nr. 7870.1

³ Tris, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Best.-Nr. 4855.2

⁴ Ficoll 400, Sigma, Best.-Nr. F4375

3.1.2 Untersuchungsplan und Probenahme

3.1.2.1 Auswahl der Betriebe

In Baden-Württemberg ist in der Region Hohenlohe, insbesondere im Gebiet um Schwäbisch Hall, die Dichte an Putenmastbetrieben hoch. Der Geflügelgesundheitsdienst Stuttgart der Tierseuchenkasse Baden-Württemberg arbeitet eng mit zahlreichen dieser Betriebe zusammen. Im Rahmen dieser Studie wurden in Absprache mit dem Geflügelgesundheitsdienst acht Betriebe ausgewählt, um diese über einen längeren Zeitraum zu beproben. Es handelte sich um Putenmastbetriebe, deren Besitzer sehr kooperativ und gewissenhaft bei der Probenahme waren. Die Betriebe hatten in der Vergangenheit Probleme mit Durchfallerkrankungen und vereinzelt hatte es auch bereits Virusnachweise mittels Elektronenmikroskopie gegeben (Astro- und Rotaviren).

3.1.2.2 Probenahme und Probenvorbereitung

Die Probenahme in den Betrieben umfasste jeweils einen Mastdurchgang von den Eintagsküken bis zur Schlachtung. Pro Stall wurde alle 2 Wochen eine Sammelkotprobe durch den Besitzer entnommen, wobei jede Sammelkotprobe aus mindestens 10 Einzelkotproben bestand, die an verschiedenen Stellen im Stall genommen worden waren. Hennen und Hähne wurden getrennt beprobt und untersucht. Aus 8 Putenbetrieben wurden insgesamt 107 Kotproben entnommen.

3.1.2.3 Datenerhebung

Bei jeder Probenahme wurde vom Besitzer ein Probenbegleitblatt ausgefüllt (Abb. 2). Auf diesem Blatt wurden klinische Auffälligkeiten, wie z.B. das Auftreten von Durchfällen im Bestand sowie ggf. das Auftreten von Durchfallerkrankungen beim betreuenden Personal protokolliert.

Am Ende der Mastperiode wurden für jeden Betrieb die wichtigsten Wirtschaftsparameter erfasst:

- Gewicht vor dem Schlachten
- Futterverwertung
- Mortalität

STUTTGART	ARUNTER	SUCHU	NGSAMT
Untersuchungen zur Bedeutu bei Durchfallerkranku	ing ausgewäl ngen von Pu	hlter Viren ten	ı
Probenahmeblatt			
Absender:			
Tag der Probenahme:			
Putenalter:Tag			
Anzahl der Sammelkotproben:			
Hähne	Hen	inen	
Zur Zeit Vorliegen von Darmerkrankungen bei:	Puten	ja	nein
	Personal	ja	nein
Bemerkungen:			

Abb. 2: Probenbegleitblatt

3.1.3 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden mit einem 80 kV-Transmissionselektronenmikroskop (Jeol, JEM-1011) durchgeführt. Als Präparationsverfahren für die Kotproben wurde die Negativkontrastierung angewendet. Diese Methode umfasst eine Vorbereitung der elektronenmikroskopischen Objektträger (Grids), die Gewinnung einer aufgereinigten und ggf. aufkonzentrierten Virussuspension aus der Probe sowie das Aufbringen der in der Suspension enthaltenen Viruspartikel auf die Grids mit anschließender Schwermetallkontrastierung des Präparates.

3.1.3.1 Präparation der Grids

Als Objektträger werden in der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) kleine Kupfer- oder Nickelnetze, sogenannte Grids verwendet. Sie sind vom Hersteller mit einer glänzenden und einer matten Seite ausgestattet, sodass zwischen Ober- und Unterseite unterschieden werden kann. Bevor man die Proben auf die Grids aufbringt, werden die Kupfernetze gereinigt, mit einem Kunststofffilm überzogen, mit Kohlestaub bedampft und zur Verbesserung der Virusanhaftung mit einer elektrischen Ladung versehen (Beglimmung) oder mit bestimmten chemischen Substanzen vorbehandelt (z.B. Alcianblau).

Für die Grid - Präparation wurden folgende Geräte und Materialien verwendet:

- Kupfergrids, 400 mesh¹
- Ultraschallbad²
- Essigsäure³
- Aceton⁴
- Aqua bidest.
- Glaschromatographiesäule mit 100ml Reservoir (s. Abb. 3)
- Glasobjektträger⁵
- 0,8% Pioloform⁶ in Chloroform⁷
- Filterpapier⁸
- Hochvakuum-Kleinbeschichtungsanlage⁹
- Kohlefaden¹⁰

Die Reinigung der Grids wurde im Ultraschallbad durchgeführt. Dabei wurden die Grids zunächst in Essigsäure 1 min lang ultrabeschallt. Im zweiten Schritt wurde die Säure

¹ Netzchen, Kupfer, 400 mesh, Art.-Nr. G2400C, PLANO GmbH, Wetzlar

² Ultraschallreiniger Emmi-6, EMAG AG

³ ROTIPURAN[®] Essigsäure, 100% p.a, 1I, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Art.-Nr. 3738.1

⁴ ROTIPURAN[®] Aceton, ≥99,5% p.a., 1I, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Art.-Nr. 9372.1

⁵ Standard-Objektträger, 1I, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Art.-Nr. 0656.1

⁶ Pioloform F Pulver, 10g, PLANO GmbH, Wetzlar, Art.-Nr. R1275

⁷ ROTIPURAN[®] Chloroform, 1I, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Art.-Nr. 3313.1

⁸ Rundfilter Ø 55mm, Macherey-Nagel GmbH, Art.-Nr. 432005

⁹ Model MED 020, BAL-TEC AG, Balzers

¹⁰ Kohlefaden "Carbon Thread", BAL-TEC AG, Balzers, Art.-Nr. LZ 02308 VN

mit gleichem Volumen Aqua bidest verdünnt und die Ultraschall-Behandlung der Grids wiederholt. Anschließend wurden die Grids acht Mal mit Aqua bidest gespült und nach jedem Spülschritt 10 Sekunden lang ultrabeschallt. Zum Schluss erfolgte eine einminütige Ultraschall-Behandlung in Aceton sowie die anschließende Trocknung der auf Filterpapier gebrachten Grids.

Nach der Reinigung wurden die Grids mit einem Plastikfilm überzogen. Dieser bildet eine Oberfläche, auf der später die Erreger anhaften bleiben. Wird der Kunststoffüberzug zu dick aufgetragen, erscheint das Präparat beim Mikroskopieren zu dunkel. Ein zu dünn aufgetragener Plastikfilm kann hingegen bei der weiteren Gridpräparation oder später durch die Einwirkung des Elektronenstrahls zerstört werden. Ein optimaler Kunsttoffüberzug sollte also dünn, elektronentransparent und gleichzeitig stabil sein. Diese Eigenschaften werden bei einer Dicke des Films von 20 bis 30 nm erreicht.



Abb. 3: Befilmungsvorrichtung für die Objektträger

Für die Kunststoffbeschichtung wurde eine Befilmungsvorrichtung (Abb. 3), bestehend aus einer Glaschromatographiesäule mit einem 100 ml Reservoir im oberen Teil aufgebaut. Als Kunststoff diente Pioloform[®]. Dazu wurde aus Pioloform[®]-Pulver und Chloroform eine 0,8% Pioloform[®]-Lösung hergestellt. Diese wurde vor der Verwendung gefiltert und anschließend dunkel bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend wurde ein sauberer und staubfreier Glasobjektträger für 10 Sekunden in das Säulenreservoir mit Pioloform[®]-Lösung eingetaucht. Die Lösung wurde anschließend langsam durch die Glaschromatographiesäule abgelassen. Der nach dem Trocknen auf dem Objekt-träger verbliebene Kunststofffilm wurde an den Kanten des Objektträgers eingeritzt und unter Anhauchen des Films auf die Oberfläche eines mit Wasser gefüllten Gefäßes gebracht (Abb. 4). Die Grids wurden mit der glänzenden Seite nach unten auf den schwimmenden Plastikfilm gelegt und diese Film-Grid-Verbindung anschließend durch Auflegen eines Filterpapiers aus dem Wasser gefischt, so dass sich die Grids am Ende der Prozedur zwischen dem Plastikfilm und dem Papier befanden (Abb. 5).



Abb. 4: Aufbringen des Kunststofffilms auf die Wasseroberfläche



Abb. 5: Abnehmen der mit dem Kunststofffilm beschichteten Grids von der Wasseroberfläche

Um die Reißfestigkeit des Plastikfilms zu erhöhen, wurden die befilmten Grids in einer Hochvakuumbeschichtungsanlage bei 5x10⁻⁵ mbar mit Kohle bedampft und anschließend in derselben Anlage bei 8 mA 30 Sekunden lang beglimmt. Durch die Glimmentladung werden die Grids negativ geladen, wodurch die Virusadsorptionsrate bei der Probenpräparation deutlich erhöht wird (10-100fach).

3.1.3.2 Probenpräparation und Negativkontrastierung

Bei der Präparation wurden die Proben verdünnt, homogenisiert, mittels Zentrifugation geklärt und die Partikel aus dem Überstand auf die Grids aufgebracht. Anschließend folgte analog zur Färbung in der Lichtmikroskopie eine Kontrastierung mit Schwermetallsalzen.

Für die Probenpräparation kamen folgende Geräte und Materialien zum Einsatz:

- Waage¹
- Zentrifuge²
- Aqua bidest
- Parafilm³
- Phosphorwolframsäure⁴ (PTA, 1%ige Lösung in Aqua bidest, pH 7,2)
- Spezialpinzetten für die TEM⁵
- Vortex-Schüttler⁶

Zuerst wurden die Sammelkotproben durch Rühren mit einem Löffel gut gemischt. Nach dem Abwiegen wurden 0,3 g Kot in ein 2 ml Eppendorf-Reagenzgefäß überführt und mit 600 µl Aqua bidest verdünnt. Nach Homogenisieren der Proben auf einem Vortex-Schüttler für mindestens 30 Sekunden folgte eine Zentrifugation bei 420 x g für 10 Minuten. Nach dem Zentrifugieren wurden 30 µl des klaren Überstands tropfenförmig auf ein Stück Parafilm gebracht. Auf diesen Tropfen wurde anschließend ein Grid mit Hilfe einer Spezialpinzette mit der beschichteten Seite nach unten aufgelegt und dort für 3 Minuten belassen. (Abb. 6).

¹ Präzisionswaage H160, Sartorius GmbH, Göttingen

² MiniSpin[®], Eppendorf

³ Parafilm[®] M, Brand GmbH, Wertheim, Art.-Nr. 701605,

⁴ Phosphorwolframsäure, Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 1.00583.0100

⁵ Selbstspannende Pinzetten, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Art.-Nr. HL64.1

⁶ Reagenzglasschüttler, VWR International GmbH

Eigene Untersuchungen



Abb. 6: Partikelabsorption auf das geladene Grid aus der aufgereinigten Probe.

Anschließend wurde das Grid wieder vom Tropfen entfernt und die noch am Grid verbliebene Flüssigkeit mit einem angefeuchteten Stück Zellstoff entfernt. In einem weiteren Schritt wurde das Grid an der Oberfläche eines Tropfens Aqua bidest 1 bis 2 Sekunden lang gewaschen, ohne das Grid vollständig in das Wasser einzutauchen. Im nächsten Schritt folgte eine Kontrastierung des Grids für 2 Minuten auf einem PTA-Tropfen (30 µl). Nach Entfernung des Grids vom Kontrastmittel wurden Reste des Kontrastmittels ebenfalls mit einem Stück angefeuchteten Zellstoff durch Anlegen des Grids in einem Winkel von 45° abgesaugt. Nach diesen Behandlungsschritten kann das Grid im Elektronenmikroskop untersucht werden.

3.1.3.3 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen erfolgten mit einem 80 kV-Transmissionselektronenmikroskop der Firma Jeol (JEM-1011).

Für Bildaufnahmen und Bildarchivierung wurde die SIS Megaview III CCD-Kamera sowie die entsprechende Bildverarbeitungs-Software AnalySIS der Firma Olympus Soft Imaging Solutions GmbH verwendet.

Die Proben wurden bei 40.000x Vergrößerung mindestens 15 Minuten lang untersucht und dabei die einzelnen Felder mäanderförmig nach Viruspartikeln abgesucht. Im Falle eines Virusfundes wurden die Partikel digital fotografiert und in elektronischer Form in einer Datenbank abgespeichert. Die Differenzierung der virusverdächtigen Partikel erfolgte aufgrund einer Größenvermessung mittels AnalySIS-Software sowie typischer Strukturmerkmale, wie sie in der Fachliteratur beschrieben sind (Doane und Anderson, 1987; Fong, 1994; Madeley und Field, 1988; Palmer und Martin, 1988; Saif, 2008).

3.1.4 Molekularbiologische Untersuchungen

Ziel der molekularbiologischen Untersuchungen war es, Genomabschnitte von Rota-, Astro- und Coronaviren mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in Kotproben von Puten nachzuweisen. Bei den verwendeten PCR-Tests handelte es sich um 3 konventionelle Reverse Transkription PCR (RT-PCR). Darüber hinaus wurden die mittels PCR amplifizierten Genomabschnitte sequenziert und ein Sequenzvergleich mit Datenbankeinträgen (NCBI) durchgeführt.

Der Nachweis mittels konventioneller PCR erfolgte in 3 Schritten. Im ersten Schritt wurde RNA aus der Probe isoliert. Danach folgte die Reverse-Transcription, bei der zunächst die RNA in DNA umgeschrieben und dann mit Hilfe von spezifischen, in-vitro synthesierten Oligonukleotiden (Primer) die Zielsequenz des Virus vervielfältigt wird. Zum Schluss wurden die PCR-Produkte (Amplifikate) im Ethidiumbromid-Agarose-Gel mittels Elektrophorese voneinander aufgetrennt und als Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht. Mithilfe von mitgeführten Größenmarkern konnte das PCR-Produkt anhand der Bandengröße identifiziert, aus dem Gel herausgeschnitten und nach einer Aufreinigung für die DNA-Sequenzierung verwendet werden.

3.1.4.1 Nukleinsäureisolierung

Folgende Geräte und Reagenzien wurden bei der RNA-Isolierung verwendet:

- Waage¹
- Zentrifuge²
- Vortex-Schüttler³
- RNeasy[®] Mini Kit⁴
- PBS-Lösung nach Dulbecco⁵
- 70% Ethanol
- 14.3 M ß-Mercaptoethanol⁶

¹ Präzisionswaage H160, Sartorius GmbH, Göttingen

² MiniSpin[®], Eppendorf

³ Reagenzglasschüttler, VWR International GmbH

⁴ RNeasy[®] Mini Kit, Qiagen GmbH, Hildern, Art.-Nr. 74124

⁵ Dulbecco A Tablets, Oxoid Deutschland GmbH, Wesel, Art. -Nr. BR0014

⁶ 2-Mercaptoethanol, Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Art. -Nr. M3148

Die Nukleinsäure-Aufreinigung erfolgte mithilfe des RNeasy[®] Mini Kits der Fa. Qiagen nach Angaben des Herstellers.

Abweichend von den Angaben des Herstellers wurden für die Nukleinsäure-Isolierung 10 mg Kot in 90 µl Aqua bidest suspendiert (Verhältnis 1:10). Zu dieser Probensuspension wurden 600 µl RLT-Puffer dazugegeben und mittels Vortex-Schüttler gründlich gemischt. Als nächstes wurden der Probe 600 µl 70%iges Ethanol hinzugefügt. Nach Durchmischen mittels Vortex-Schüttler wurden 650 µl des Reaktionsansatzes auf die im Aufreinigungskit enthaltene RNeasy[®] Mini-Spinsäule überführt, welche wiederum in ein 2 ml Sammelgefäß eingesetzt wurde. Die Elution gebundener DNA erfolgte mit 30 µl DNAse-freien Wasser (Bestandteil des Kits). Die Eluate wurden bis zur PCR-Durchführung bei -70°C aufbewahrt.

3.1.4.2 Polymerase-Kettenreaktion

Da Astro-, Rota- und Coronaviren zu den RNA-Viren gehören, die eigentliche PCR aber als Substrat ("template") DNA benötigt, muss die virale RNA mit Hilfe eines Enzyms (Reverse Transkriptase) zunächst in DNA umgeschrieben werden (RT-Reaktion). Darauf folgt die eigentliche PCR, bei der die DNA durch ein weiteres Enzym (Taq-Polymerase) exponentiell vermehrt wird. Dies geschieht in mehreren hintereinander folgenden Zyklen, die aus einem Denaturierungsschritt (ca. 95°C, Trennung des DNA Doppelstrangs), einem Annealingschritt (ca. 58°C, Hybridisierung der Primer an einen der beiden DNA-Stränge) sowie einem Elongationsschritt (ca. 72°C, vom Primer ausgehende Verlängerung des neuen DNA-Strangs) bestehen. Sowohl beim RT-Schritt als auch bei der eigentlichen PCR werden spezifische, nur am Virusgenom hybridisierende Primer benutzt, wodurch ein spezifischer Nachweis der Virus-RNA ermöglicht wird. Für die PCR kam das Qiagen One Step RT-PCR Kit[®] zur Anwendung. Durch den Einsatz dieses PCR-Kits ist die Durchführung der RT-Reaktion und die daran anschließende eigentliche PCR ohne Unterbrechung in einem Reaktionsgefäß möglich (One Tube RT-PCR).

3.1.4.2.1 Astrovirus RT-PCR

Auswahl der geeigneten Primer

Als Zielsequenz für die PCR-Primer wurde das ORF1b-Segment des Astrovirusgenoms ausgewählt. Dieses Gen codiert für die RNA-abhängige RNA-Polymerase. Die Genksequenzen (Tabelle 1) zur Ermittlung der Primer wurden aus der Gendatenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI: <u>www.ncbi.nlm.nih.gov</u>) genommen.

Tabelle 1: Sequenzen der NCBI-Gendatenbank, die für die Auswahl der Primer für die Astrovirus RT-PCR verwendet wurden.

Genbank Accessionnumber	Sequenzdefinition
DQ 381330	Turkey astrovirus isolate 1232/00 polymerase gene
DQ 324814	Turkey astrovirus 2 MN-SEP-A805-05 polymerase gene
AY 320043	Turkey astrovirus 2 polymerase protein gene
AF 206663	Turkey astrovirus 2 polyprotein gene, RNA polymerase gene, capsid protein gene

Aus den o.g. Sequenzen wurde mit Hilfe der Online-Software ClustalW (<u>www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw</u>) ein multiples Alignment erstellt. Durch die Analyse des multiplen Alignments wurden konservierte Sequenzbereiche ermittelt. Anschließend wurden die Primer-Sequenzen mittels Primer Express Software 2.0 der Fa. Applied Biosystems entworfen (Tabelle 2).

Tabelle 2: Primer für die Astrovirus RT-PCR.

Forward-Primer	5'-TGGTGATGGAGATAGGTATTTTGTTG-3'
Reverse-Primer	5'-GCAGCTCTTTCTCTGTTGGCAG-3'

Die Länge des PCR-Produkts betrug 344 bp.

Die Primer wurden nach unseren Vorgaben bei der Fa. Eurogentec S. A. synthetisiert.

Beschaffung der Positivkontrolle

Als Positivkontrolle für die RT-PCR dienten die Feldproben, in denen mittels Elektronenmikroskopie Astroviren eindeutig nachgewiesen worden waren. Die von diesen Proben gewonnenen PCR-Produkte wurden anschließend sequenziert.

Die Ergebnisse der DNA-Sequenzierungen wurden durch den Vergleich mit den Sequenzen der NCBI-Genbank als Astrovirusgenom bestätigt.

Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion

Für die RT-PCR wurden folgende Reagenzien und Geräte verwendet:

- QIAGEN OneStep RT-PCR Kit¹
- PCR-Primer
- Thermocycler²

Die für die RT-PCR notwendigen Reagenzien wurden zunächst in ein 0,5 ml EppendorfGefäß pipettiert. In Tabelle 3 sind die einzelnen Reagenzien für die RT-PCR aufgeführt. Jedes Reaktionsgefäß enthielt 45 µl des Primer-Enzymmixes. Zu jedem Reaktionsansatz wurden 5 µl der isolierten Proben-RNA dazugegeben. Die RT-PCR wurde im Thermocycler (siehe vorne) durchgeführt. Das Temperaturprogramm ist in Tabelle 4 zusammengefasst.

Die Amplifikate wurden nach der RT-PCR bis zur Gelelektrophorese bei 4°C aufbewahrt.

Reagenzien des QIAGEN OneStep RT-PCR Kit		
(alle Angaben in μl)		
DEPC-Wasser	28,5	
dNTP-Mix	2	
5 x RT-PCR Puffer	10	
RNase Inhibitor	0,5	
Enzym-Mix	2	
Forward -Primer (100 µM)	1	
Reverse-Primer (100 µM) 1		
Summe Mastermix	45	

Tabelle 3: Pipettierschema für die Astrovirus RT-PCR.

¹ OneStep RT-PCR Kit, Qiagen GmbH, Hildern, Art.-Nr. 210212

² Mastercycler[®] Gradient 5331, Eppendorf AG, Hamburg
Programm- schritt Nr.	Programmeinstellungen	RT-PCR-Schritt								
1	30 min, 50°C	reverse Transkription des RNA-Stranges								
2	15 min, 95°C	Beenden der reversen Transkription und Aktivierung der HotStarTaq DNA Polymerase								
3	15 sec, 95°C	Denaturierung der DNA-Stränge								
4	30 sec, 58°C	Annealing der Primer								
5	1 min, 72°C	Amplifikation								
6	weiter mit dem Schritt 3; 39 x	Wiederholung des 3-Schritt-Zyklus								
7	10 min, 72°C	Endphase (finale Amplifikation)								

Tabelle 4: Temperaturprogramm des Thermocyclers.

3.1.4.2.2 Coronavirus RT-PCR

Auswahl der geeigneten Primer

Die Coronavirus RT-PCR wurde nach Angaben von Cavanagh et al. (2001) durchgeführt. Die Primer amplifizieren einen 266 bp langen Abschnitt des äußeren Bereiches der 3`UTR-Region des Coronavirusgenoms. Der Vorwärts-Primer lagert sich an der Position 41 des 3`UTR-Endes (UTR41⁺ Primer) an, der Rückwärts-Primer an die Position 11 des 3`UTR-Endes (UTR11⁻ Primer). In Tabelle 5 sind die Sequenzen der beiden RT-PCR Primer aufgeführt.

Tabelle 5: Primer für Coronavirus RT-PCR.

Forward-Primer	5'-ATGTCTATCGCCAGGGAAATGTC-3'
Reverse-Primer	5'-GCTCTAACTCTATACTAGCCTA-3'

Beschaffung der Positivkontrolle

Aufgrund der sehr niedrigen Variabilität des äußeren Abschnitts der 3`UTR Region sind die Genomsequenzen des Turkey Coronavirus (TCoV) und des Infektiösen Bronchitisvirus des Huhns (IBV) sehr ähnlich. Die bei uns eingesetzten UTR11⁻ / UTR41⁺ Primer amplifizieren den entsprechenden Genomabschnitt beider Viren. Daher konnte der IBV-Impfstamm H120 (TAD[®] IB vac I) als Positivkontrolle verwendet werden. (Cavanagh et al., 2001).

Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion

Die einzelnen Schritte der Coronavirus RT-PCR entsprechen denen des oben beschriebenen Ablauf der Astrovirus RT-PCR (siehe Punkt 3.1.3.2.1).

3.1.4.2.3 Rotavirus RT-PCR

Auswahl der geeigneten Primer

Die Primer, die für die Rotavirus RT-PCR ausgewählt wurden, amplifizieren den konservierten NSP4-Abschnitt des Rotavirusgenoms. Die zur Auswahl der Primer verwendeten NCBI-Genbank-Sequenzen sind in der Tabelle 6 aufgelistet. Nach der Analyse des der in der NCBI-Datenbank veröffentlichten NSP4-Gensequenzen (alle ca. 700 bp lang) konnten nur wenige homologe und somit für das Primerdesign passende Stellen gefunden werden.

Genbank Accessionnumber	Sequenzdefinition
AY 062937	Avian rotavirus AvRV-1 nonstructural protein 4 gene
AB 065286	Avian rotavirus Ty-3 gene for nonstructural protein NSP4
AB 065285	Avian rotavirus Ty-1 gene for nonstructural protein NSP4

Tabelle 6: Primer für die Rotavirus RT-PCR.

Die für die Ermittlung der optimalen Primersequenzen notwendigen Schritte sind unter dem Punkt 3.1.3.2.1 beschrieben. In Tabelle 7 sind die von uns ausgewählten Primersequenzen zu finden. Tabelle 7: Primer für die Rotavirus RT-PCR.

Forward-Primer	5'-CCGTGIGGAAAGATGGAGAAC-3'
Reverse-Primer	5'-GTTIGGGTACCAGGGATTAAGICTTC-3'

Um möglichst viele Rotavirus-Stämme mit der entwickelten PCR nachweisen zu können, musste an drei Stellen losin in die Primer integriert werden

Das durch die Primer amplifizierte PCR-Produkt ist 651 bp lang.

Beschaffung der Positivkontrolle

Die Auswahl der Positivkontrolle für die Rotavirus RT-PCR wurde entsprechend der Vorgehensweise welche bereits bei der Astrovirus RT-PCR beschrieben wurde getroffen (s. Punkt 3.1.3.2.1). Auch hier kamen Feldproben zum Einsatz.

Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion

Im Gegensatz zu Astro- und Coronaviren besitzt das Rotavirus ein doppelsträngiges RNA-Genom. Um eine optimale Umschreibung der viralen RNA in eine Template-DNA zu erreichen, wurden die aufgereinigten Probeneluate zuerst für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und danach sofort in Flüssigstickstoff bei -196°C eingefroren. So blieben die denaturierten RNA-Stränge zunächst voneinander getrennt. Erst danach wurde der PCR-Mastermix auf die gefrorene Probe pipettiert. Die weiteren RT-PCR Schritte erfolgten entsprechend Kapitel 3.1.3.2.1.

3.1.4.3 Gelelektrophorese und Auswertung der PCR

Das Endprodukt der PCR (Amplifikat) wurde nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel mittels Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Für die Gelelektrophorese und die anschließende Auswertung wurden folgende Geräte und Reagenzien verwendet:

- Elektrophoresekammer¹
- Elektrophorese-Netzgerät²
- Geldokumentationssystem³
- Agarose-Gel (1,5%) (siehe 3.1.1)
- Laufpuffer (siehe 3.1.1)
- Ladungs-Puffer (siehe 3.1.1)
- DNA-Molekulargewichtsmarker⁴

3.1.4.3.1 Aufreinigung der PCR-Amplifikate

Die Aufreinigung der mittels PCR gewonnenen DNA-Amplifikate aus dem Agarosegel erfolgte mit Hilfe des QIAquick[®] PCR Purification Kits (Fa. Qiagen) nach Angaben des Herstellers.

3.1.4.3.2 Durchführung der Sequenzierung

Die Sequenzierung der PCR-Amplifikate wurde in unserem Auftrag von der Firma Biosynth (Fa. Biosynth AG, Staad, Schweiz) durchgeführt.

¹ Flachgel-Elektrophoresekammer, von Keutz Labortechnik, Reiskirchen

² Power Supply E433, Consort nv, Turnhout, Belgium

³ AlphaDigiDoc 1000, Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, USA

⁴ PCR 100 bp DNA Ladder, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Best.-Nr. SM 0241

3.1.4.3.3 Analyse der Sequenzierungsergebnisse

Die Sequenzierungsergebnisse unserer Isolate wurden sowohl untereinander als auch mit Astro- und Rotavirusgensequenzen der NCBI-Datenbank (<u>www.ncbi.nlm.nih.gov</u>) mit Hilfe der Online-Software ClustalW verglichen (<u>www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw</u>).

Phylogenetische Bäume wurden mittels DNA Parsimony Algorytmus (PHYLIP V3.65 <u>http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py</u>) und Analysesoftware MEGA 4.0 erstellt.

3.1.5 Untersuchungen zum Nachweis von Salmonellen

Die Untersuchungen der Kotproben auf Salmonellen hatten zum Ziel, diese Erreger als Durchfallursache differentialdiagnostisch auszuschließen. Der Salmonellen-Nachweis wurde gemäß den Anforderungen der Europäischen Norm ISO 6579 (International Organization for Standardization, 2007) durchgeführt.

Für die Untersuchung wurden folgende Geräte und Materialien verwendet:

- Brutschrank 37°C¹
- Brutschrank 42°C²
- Waage³
- gepuffertes Peptonwasser (siehe 3.1.1)
- modifiziertes halbfestes Rappaport-Vassiliadis Medium (Modified Semi-Solid Rappaport-Vassiliadis Agar (MSRV-Agar), siehe 3.1.1)
- Phenolrot-Agar (siehe 3.1.1)
- Rambach-Agar⁴
- Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar (XLD-Agar, siehe 3.1.1)
- Salmonellen-Antiseren⁵
- Glasobjektträger⁶

¹ Modell B5060, Heraeus GmbH, Hanau

² Model BD 115/E2, Binder GmbH, Tuttlingen

³ Präzisionswaage 1002MP9, Sartorius GmbH, Göttingen

⁴ Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 1.13999.0001

⁵ Enteroclon, SIFIN, Berlin

⁶ Standard-Objektträger, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Art.-Nr. 0656.1

Zur Isolierung von Salmonella-Keimen wurden die Proben bei 37°C in gepuffertem Peptonwasser für 24 Stunden vorangereichert. Von den Sammelkotproben wurden 10 g in 90 ml (1:10) Voranreicherung verdünnt. Nach der Bebrütung wurden 0,1 ml der Voranreicherung auf modifiziertes halbfestes Rappaport-Vassiliadis-Medium (MRSV-Agar) als Selektivanreicherung überimpft. Die Bebrütung erfolgte bei 41°C für 24 Stunden. Danach wurde jeweils eine Öse auf die Selektivmedien Brilliant-Phenolrot-Lactose-Agar, Rambach-Agar und Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar ausgestriechen und die Platten für weitere 24 Stunden bei 37°C bebrütet. Die Auswertung der Platten erfolgte entsprechend den Literaturangaben (Baumgart, 2004; Selbitz, 2007). Die Salmonellen-verdächtigen Keime wurden anschließend mit Hilfe der Objektträgeragglutination unter Verwendung spezifischer Salmonellen-Antiseren getestet.

3.1.6 Parasitologische Untersuchungen

Die Sammelkotproben wurden parasitologisch mittels Flotationsverfahren untersucht, um Parasiten als Ursache von Durchfallerkrankungen auszuschließen.

Für die Untersuchung wurden folgende Geräte und Reagenzien benötigt:

- Zentrifuge¹
- Waage²
- Mikroskop³
- Sieb⁴
- Trichterbecher⁵
- Platinösen⁶
- Objektträger⁷
- Deckgläser⁸
- Flotationslösung (siehe 3.1.1)

¹ Zentrifuge Rotanta 46RC, Rotor VK-Nr .-4446, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

² Präzisionswaage BL1500S, Sartorius GmbH, Göttingen

³ Lichtmikroskop Eclipse 400, Nikon Corporation

⁴ Rotilabo[®] Rundsieb 100mm, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Art.-Nr. 8096.1

⁵ Kartell[®] Messbecher konisch 250ml, Mercateo, Art.-Nr. 163-9013774

⁶ Rotilabo[®] Impfösen Platin/Iridium 5mm, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Art.-Nr. KN03.1

⁷ Standard-Objektträger, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Art.-Nr. 0656.1

⁸ Deckgläser quadratisch, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Art.-Nr. 0657.1

Vor der Untersuchung wurden die Proben sorgfältig mittels Löffel durchmischt. Im ersten Schritt wurden 5 g Kot mit Leitungswasser verdünnt, mit einem Glasstab gut verrührt und durch einen Sieb in einen Trichterbecher gekippt. Nach ca. 10 Minuten wurde das Sediment in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 Minuten bei 310 x g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen, das Sediment mit Flotationslösung aufgefüllt, resuspendiert und nochmals für 5 Minuten bei 310 x g zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurden die Proben für 10 Minuten stehen gelassen. Schließlich wurden 2 bis 3 Tropfen aus der obersten Schicht der Probe mittels einer Platinöse auf den Objektträger überführt, mit dem Deckglas abgedeckt und bei 200-facher Vergrößerung im Lichtmikroskop untersucht. Die morphologische Beurteilung erfolgte entsprechend den Angaben aus der Fachliteratur (Boecking, 2006; Eckert et al., 2008). Bei der semiquantitativen Bewertung der nachgewiesenen Kokzidienoozysten wurde folgender Bewertungsschlüssel verwendet: $+ \triangleq 1-3$; $++ \triangleq 4-20$; $+++ \triangleq 21-100$; ++++ > 100 Kokzidienoozysten pro Gesichtsfeld.

3.1.7 Berechnung der wirtschaftlichen Parameter

Anhand der von den jeweiligen Besitzern zur Verfügung gestellten Daten wurde die Mortalität am Ende eines Durchgangs für Hennen und Hähne getrennt ermittelt. Das Lebendgewicht am Schlachttag wurde für die weiblichen und die männlichen Tiere berechnet. Die Futterverwertung konnte systembedingt nur als Gesamtergebnis für Hennen und Hähne zusammen angegeben werden.

3.2 Ergebnisse

Es wurden insgesamt 107 Kotproben aus acht ausgewählten Putenbetrieben mittels Elektronenmikroskopie und PCR auf Viren untersucht. Weiterhin wurden die Proben auf das Vorkommen von Salmonellen sowie Kokzidien und Helminthen getestet.

3.2.1 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Im Rahmen der elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden in den Kotproben zahlreiche Astro- und Rotaviruspartikel gefunden (s. Abb. 7 und Abb. 8). In keiner der Proben konnten Coronaviruspartikel identifiziert werden. Vereinzelt wurden Adenoviren nachgewiesen (Abb. 9).



Abb. 7: Astroviruspartikel im Putenkot. Pfeil: eine typische sternähnliche Partikelform. (Negativkontrastierung mit PTA, Messbalken 200nm, Bild: CVUA-Stuttgart 2010)



Abb. 8: Rotaviruspartikel im Putenkot: A. intakte Viruspartikel; B. Viruspartikel ohne äußere Proteinschicht (Negativkontrastierung mit PTA, Messbalken 100nm, Bild: CVUA-Stuttgart)



Abb. 9: Adenoviruspartikel im Putenkot (Negativkontrastierung mit PTA, Messbalken 100nm, Bild: CVUA-Stuttgart)

Eine Übersicht über die Ergebnisse in den einzelnen Betrieben wird in den Tabellen 8 bis 15 nach weiblichen und männlichen Tieren getrennt dargestellt.

Virus	Casablaabt		Putenalter (Wochen)										
virus	Geschiecht	0-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	13-14	15-16	17-18	19-20		
	ð	+	-	-	+	_	+	-	-	-	n.d.		
Astrovirus	Ŷ	+	+	+	-	+	+	-	n.d.	n.d.	n.d.		
Detevieve	ð	+	+	+	+	_	-	+	-	-	n.d.		
Rotavirus	Ŷ	+	+	-	+	+	+	-	n.d.	n.d.	n.d.		
Adenovirus	3	-	-	_	_	+	-	_	-	-	n.d.		
	Ŷ	-	-	-	+	-	-	-	n.d.	n.d.	n.d.		

Tabelle 8: Elektronenmikroskopische Befunde in Betrieb 1.

n.d. = nicht durchgeführt

Aus Betrieb 1 wurden Proben von Tieren im Alter von 1 bis 18 Wochen (\bigcirc Tiere), respektive 14 Wochen (\bigcirc Tiere) untersucht. Über den gesamten Zeitraum konnten Astro- und Rotaviren nachgewiesen werden. Außerdem wurden bei den Hennen im Alter von 7 bis 8 Wochen und bei den Hähnen im Alter von 9 bis 10 Wochen Adenoviren gefunden.

Virus	Coschlocht		Putenalter (Wochen)											
Virus	Geschiecht	0-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	13-14	15-16	17-18	19-20			
Astrovirus	ð	+	-	-	-	-	-	-	+	n.d.	-			
	Ŷ	+	-	-	-	-	-	-	n.d.	n.d.	n.d.			
Deterring	ð	-	-	+	+	-	+	-	-	n.d.	-			
Rotavirus	0 +	-	-	+	+	-	-	-	n.d.	n.d.	n.d.			
Adenovirus	8	-	-	-	-	-	-	-	-	n.d.	-			
	Ŷ	-	-	-	+	-	-	-	n.d.	n.d.	n.d.			

Tabelle 9: Elektronenmikroskopische Befunde in Betrieb 2.

n.d. = nicht durchgeführt

Die Hähne des Betriebs 2 wurden über die gesamte Mastperiode beprobt (von der ersten bis zur zwanzigsten Woche), wobei die Probenahme bei 17 bis 18 Wochen alten Tieren ausgeblieben ist. Bei den Hennen wurden die Proben bis zum Alter von 14 Wochen entnommen. Bereits in der ersten Probe von Tieren im Alter bis zur zweiten Lebenswoche konnten Astroviren nachgewiesen werden. Im weiteren Untersuchungsverlauf wurden Astroviren nur noch bei den 15 bis 16 Wochen alten Hähnen gefunden. Alle anderen Proben blieben im weiteren Verlauf der Untersuchungsperiode Astrovirus negativ. Rotaviren dagegen wurden bei Tieren beider Geschlechtsgruppen im Alter zwischen 5. und 8. Lebenswoche nachgewiesen. Eine weitere Probe von Hähnen (entnommen zwischen 11. und 12. Lebenswoche) war ebenfalls Rotavirus positiv. In einer Kotprobe von Hennen (7-8 Wochen alt) wurden außerdem Adenoviren gefunden.

Viruo	Casablaabt		Putenalter (Wochen)											
VILUS	Geschieum	0-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	13-14	15-16	17-18	19-20			
A stassians	ð	-	+	+	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
Astrovirus	Ŷ	+		_		_	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
Deterring	ð	-	+	+	+	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
Rolavirus	Ŷ	-	+	+	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
Adenovirus	ð	-	-	-	-	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
	Ŷ	-	-	-	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			

Tabelle 10: Elektronenmikroskopische Befunde in Betrieb 3.

n.d. = nicht durchgeführt

Die Tiere von Betrieb 3 wurden lediglich bis zur Hälfte der Mastzeit beprobt (bis zur 10. Lebenswoche). Bei den Untersuchungen von Proben männlicher Tiere konnten Doppelinfektionen mit Astro- und Rotaviren festgestellt werden. Die Kotproben weiblicher Tiere zeigten positive Ergebnisse nur bei Astro- oder Rotaviren. Bei einer Probe der Putenhähne, die in der Zeit zwischen der 9. und 10. Lebenswoche entnommen worden war, konnten zusätzlich Adenoviren nachgewiesen werden.

Virus	Geschlecht	Putenalter (Wochen)											
	Geschiecht	0-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	13-14	15-16	17-18	19-20		
Astrovirus	8	+	-	-	+	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.		
	Ŷ	-	+	+	-	-	n.d.	-	n.d.	n.d.	n.d.		
Detevirue	ð	+	+	-	+	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.		
Rolavirus	Ŷ	+	-	+	+	-	n.d.	-	n.d.	n.d.	n.d.		
Adenovirus	8	-	_	-	-	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.		
	Ŷ	-	-	-	-	-	n.d.	-	n.d.	n.d.	n.d.		

Tabelle 11: Elektronenmikroskopische Befunde in Betrieb 4.

n.d. = nicht durchgeführt

Betrieb 4 wurde bis zur 18. (♂ Tiere), respektive 14. (♀ Tiere) Lebenswoche beprobt. In den Lebenswochen 11 bis 12, 15 bis 16 und 19 bis 20 wurden keine Proben entnommen. Beide Tiergruppen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten positiv auf Astro- und Rotaviren getestet. Die Hähne wiesen schon in den ersten Lebenswochen Doppelinfektionen auf. Insgesamt gelang der Nachweis von Astro- und Rotaviren bis zur 8. Lebenswoche.

Viruo	Casablaabt	Putenalter (Wochen)										
Virus	Geschiecht	0-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	13-14	15-16	17-18	19-20	
Astrovirus	Ŷ	+	+	+	+	-	n.d.	+	-	n.d.	n.d.	
Rotavirus	Ŷ	+	+	+	+	-	n.d.	-	-	n.d.	n.d.	
Adenovirus	Ŷ	-	-	+	+	-	n.d.	-	-	n.d.	n.d.	

n.d. = nicht durchgeführt

In Betrieb 5 wurden nur Hennen gemästet. Die Tiere wiesen schon ab den ersten Lebenswochen Doppelinfektionen (Astro- und Rotaviren) auf. In den Proben, die im Zeitraum von der 5. bis zur 8. Lebenswoche genommen worden waren, konnten zusätzlich Adenoviren nachgewiesen werden.

Viruo	Casablaabt		Putenalter (Wochen)											
Virus	Geschiecht	0-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	13-14	15-16	17-18	19-20			
Astrovirus	ð	-	-	-	-	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
	Ŷ	-	+	-	-	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
Detevirue	ð	+	-	-	-	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
Rolavirus	Ŷ	+	+	-	+	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
Adenovirus	8	-	-	-	-	+	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
	Ŷ	-	-	-	-	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			

Tabelle 13: Elektronenmikroskopische Befunde in Betrieb 6.

n.d. = nicht durchgeführt

Die Tiere des Betriebes 6 wurden nur bis zur 12. Lebenswoche beprobt. Bei den Hähnen wurden Rotaviren mittels Elektronenmikroskopie nur in der erste Probe, Astroviren hingegen in keiner der Proben nachgewiesen. Bei einer Probe (Entnahmezeitraum zwischen der 9. und der 10. Lebenswoche) wurden Adenoviren gefunden. Bei den weiblichen Tieren wurde neben zwei ausschließlichen Rotavirus-Befunden auch eine Doppelinfektion mit Astro- und Rotaviren festgestellt.

Virus	Gaschlacht		Putenalter (Wochen)										
Virus	Geschiecht	0-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	13-14	15-16	17-18	19-20		
Astrovirus	ð	+	-	+	-	-	+	-	-	n.d.	-		
	Ŷ	+	-	+	-	-	-	-	-	n.d.	n.d.		
Detevirue	Š	-	+	+	-	-	-	-	-	n.d.	-		
Rotavirus	Ŷ	+	+	+	-	-	-	-	-	n.d.	n.d.		
Adenovirus	ð	-	-	+	-	+	-	+	-	n.d.	-		
	\$	-	-	-	-	-	-	-	-	n.d.	n.d.		

Tabelle 14: Elektronenmikroskopische Befunde in Betrieb 7.

n.d. = nicht durchgeführt

Die Beprobung der Tiere des Betriebes 7 erfolgte bis zur letzten Woche vor der Schlachtung (Hähne 20. und Hennen 16. Lebenswoche). Lediglich zwischen der 17. und 18. Lebenswoche wurden die Hähne nicht beprobt. Tiere beider Geschlechter zeigten sowohl Einzel- als auch Doppelinfektionen mit Astro- und Rotaviren. In Kotproben der männlichen Tiere konnten darüber hinaus mit Beginn der 5. Lebenswoche insgesamt dreimal Adenoviren nachgewiesen werden.

Virus	Casablaabt	Putenalter (Wochen)										
Virus	Geschiecht	0-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	13-14	15-16	17-18	19-20	
Astrovirus	ð	-	-	+	-	+	-	+	-	-	n.d.	
Astrovirus	Ŷ	-	-	-	+	-	-	+	n.d.	n.d.	n.d.	
Detevirue	Š	+	+	-	-	-	-	-	-	-	n.d.	
Rolavirus	Ŷ	+	+	+	-	-	+	-	n.d.	n.d.	n.d.	
	8	-	-	-	+	+	-	-	-	-	n.d.	
Adenovirus	Ŷ	-	-	-	+	+	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	

Tabelle 15: Elektronenmikroskopische Befunde in Betrieb 8.

n.d. = nicht durchgeführt

Tiere des Betriebes 8 wurden nahezu über die gesamte Mastzeit beprobt. Lediglich die letzte Probenahme wurde in diesem Bestand nicht durchgeführt. Einzelinfektionen mit Astro- oder Rotaviren wurden bis zur 14. Lebenswoche in beiden Tiergruppen nachgewiesen. Doppelinfektionen konnten dagegen in keiner der Proben festgestellt werden. Darüber hinaus wurden in der Zeit zwischen der 7. und der 10. Lebenswoche sowohl bei Hähnen als auch bei Hennen Adenoviren gefunden.

3.2.1.1 Vergleichende Darstellung der elektronmikroskopischen

Virusnachweise in allen acht Betrieben

Die Tabellen 16 und 17 zeigen eine Übersicht über die positiven Virusnachweise in allen acht Betrieben für männliche (Tabelle 16) und weibliche (Tabelle 17) Puten.

Betrieb	Proben-	Astrovirus positiv	Rotavirus positiv	Adenovirus positiv
1	9	3	5	1
2	9	2	3	0
3	5	2	3	1
4	7	2	3	0
5	0*	0*	0*	0*
6	6	0	1	1
7	9	3	2	3
8	9	3	2	2
Summe	54	15	19	8
Anteil	positiver	27,8%	35,2%	14,8%

Tabelle 16: Übersicht über die Anzahl von Virusnachweisen mittels TEM bei männlichen Tieren.

* In Betrieb 5 wurden nur Hennen gehalten

Tabelle 17: Übersicht über die Anzahl von Virusnachweisen mittels TEM bei weiblichen Tieren.

Betrieb	Proben-	Astrovirus positiv	Rotavirus positiv	Adenovirus positiv
1	7	5	5	1
2	7	1	2	1
3	5	1	2	0
4	6	2	3	0
5	7	5	4	2
6	6	1	3	0
7	8	2	3	0
8	7	2	4	2
Summe	53	19	26	6
Anteil p	positiver	35,9%	49,1%	11,3%

Wie aus den Tabellen 16 und 17 hervorgeht, liegt die Zahl der positiven Astro- (35,9%) und Rotavirus-Nachweise (49,1%) bei den Hennen deutlich höher als bei den Hähnen (27,8% bzw. 35,2%).

Adenoviruspartikel wurden bei 13,1% (14) der untersuchten 107 Proben gefunden. Alle positiven Proben stammten von über 5 Wochen alten Puten. Die Tiere aller acht Betriebe wurden im Alter von 4 Wochen mit einer Lebend-Vakzine gegen Hämorrhagische Enteritis (Adenovirusinfektion) über das Trinkwasser immunisiert.

Tabelle 18 zeigt eine Übersicht über den Infektionsverlauf in den beprobten Betrieben. Die Ergebnisse sind unabhängig vom Geschlecht der Tiere dargestellt (d.h. ein Betrieb gilt als positiv, sobald in mindestens einer der beiden Geschlechtsgruppen Viren nachgewiesen wurden).

Die Auswertung der Ergebnisse zeigt, dass in den Proben aller acht Betriebe sowohl Astro- als auch Rotaviren vorhanden waren. In den ersten 10 Lebenswochen ist der Anteil der positiven Virusnachweise deutlich höher (77%) als in der zweiten Hälfte der Mastzeit, in der nur etwa 38% der untersuchten Proben positiv waren. Die meisten Doppelinfektionen waren in den Betrieben 1, 4 und 5 zu verzeichnen.

						Putena	lter (Wo	ochen)			
Betrieb	Virus	0-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	13-14	15-16	17-18	19-20
1	Astro	+	+	+	+	+	+	-	-	-	5
	Rota	+	+	+	+	+	+	+	-	-	n.a.
2	Astro	+	-	-	-	-	-	-	+	nd	-
2	Rota	-	-	+	+	-	+	-	-	n.u.	-
2	Astro	+	+	+	-	-	nd	n d	۶d	٦d	5
3	Rota	-	+	+	+	-	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.u.
1	Astro	+	+	+	+	-	nd	-	nd	-	nd
4	Rota	+	+	+	+	-	n.u.	-	n.u.	-	n.u.
5	Astro	+	+	+	+	-	nd	+	-	nd	n d
5	Rota	+	+	+	+	-	n.u.	-	-	n.u.	n.u.
6	Astro	-	+	-	-	-	-	nd	nd	nd	þ
0	Rota	+	+	-	+	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
7	Astro	+	-	+	-	-	+	-	-	nd	-
	Rota	+	+	+	-	-	-	-	-	n.u.	-
0	Astro	-	_	+	+	+	-	+	-	-	nd
0	Rota	+	+	+	-	-	+	-	-	-	n.u.

Tabelle 18: Übersicht über die Nachweise von Astro- und Rotaviren mittels TEM in allen 8 Betrieben.

3.2.2 Molekularbiologische Untersuchungen

Alle gesammelten Kotproben wurden mittels konventioneller RT-PCR auf Astro-, Corona- und Rotaviren untersucht. Anschließend wurden die entsprechenden Genabschnitte bei positiven Virusnachweisen in jeweils einmal pro Betrieb sequenziert und mit den Sequenzen der NCBI-Datenbankeintragungen verglichen.

3.2.2.1 Virusnachweise in den einzelnen Betrieben

In den Tabellen 10 bis 17 sind die Ergebnisse aller PCR-Untersuchungen nach Betrieben getrennt dargestellt. In den meisten Proben konnte Astro- und Rotavirus-RNA nachgewiesen werden. Dagegen blieb der Nachweis von Coronavirusgenom bei allen Proben aus.

Virus	Casablaabt		Putenalter (Wochen)										
VIIUS	Geschiecht	0-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	13-14	15-16	17-18	19-20		
Astrovirus	8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n.d.		
Astrovirus	Ŷ	+	+	+	+	+	+	+	n.d.	n.d.	n.d.		
Deterringe	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n.d.		
Rolavirus	Ŷ	+	+	+	+	+	+	+	n.d.	n.d.	n.d.		
Coropoviruo	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.d.		
Coronavirus	Ŷ	-	-	-	-	-	-	-	n.d.	n.d.	n.d.		

Tabelle 19: PCR-Befunde in **Betrieb 1**.

n.d. = nicht durchgeführt

Bei allen in Betrieb 1 entnommenen Proben wurden sowohl Astro- als auch Rotavirus-RNA nachgewiesen. Dies bedeutet, dass sowohl weibliche als auch männliche Tiere des Bestandes von der ersten Lebenswoche bis zur Schlachtung Doppelinfektionen aufwiesen.

Virus	Geschlecht-		Putenalter (Wochen)										
Virus	Geschiecht	0-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	13-14	15-16	17-18	19-20		
Actrovinue	ð	+	+	+	+	+	+	+	+	n.d.	+		
Astrovirus	Ŷ	+	+	+	+	+	+	+	n.d.	n.d.	n.d.		
Detevirue	ð	-	+	+	+	-	+	+	-	n.d.	+		
Rolavirus	Ŷ	-	+	+	+	+	-	-	n.d.	n.d.	n.d.		
Coropoviruo	ð	-	-	-	-	-	-	-	-	n.d.	-		
Coronavirus	Ŷ	-	-	-	-	-	-	-	n.d.	n.d.	n.d.		

Tabelle 20: PCR-Befunde in **Betrieb 2**.

n.d. = nicht durchgeführt

In Betrieb 2 konnte bei allen Proben Astrovirus-RNA mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Rotaviren konnten bei weiblichen Tieren im Alter bis zur 10. Lebenswoche, bei männlichen Tieren bis zum Ende der Mast nachgewiesen werden. In den ersten zwei Lebenswochen konnten in beiden Geschlechtsgruppen keine Rotavirus-RNA nachgewiesen werden.

Tabelle 21:	PCR-Befunde	in	Betrieb	3.
-------------	-------------	----	---------	----

Virus	Casablaabt		Putenalter (Wochen)										
VIIUS	Geschiecht	0-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	13-14	15-16	17-18	19-20		
Astrovirus	8	+	+	+	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
Astrovirus	Ŷ	+	+	+	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
Detevirue	8	+	+	+	+	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
Rolavirus	Ŷ	+	+	+	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
Coropovirus	8	-	-	-	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
Coronavirus	Ŷ	-	-	-	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		

n.d. = nicht durchgeführt

Bis auf eine Ausnahme (Hähne in der 9.-10. Lebenswoche) konnten in allen Proben Astro- und Rotaviren (Doppelinfektionen) nachgewiesen werden.

Virus	Casablaabt		Putenalter (Wochen)										
Virus	Geschiecht	0-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	13-14	15-16	17-18	19-20		
Astrovirus	S.	+	+	+	+	+	n.d.	+	n.d.	-	n.d.		
Astrovirus	Ŷ	+	+	+	+	+	n.d.	+	n.d.	n.d.	n.d.		
Deterring	S	+	+	-	+	+	n.d.	+	n.d.	+	n.d.		
Rolavirus	Ŷ	+	+	+	+	+	n.d.	+	n.d.	n.d.	n.d.		
Coronoviruo	6	-	-	-	_	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.		
Coronavirus	Ŷ	-	-	-	-	-	n.d.	-	n.d.	n.d.	n.d.		

Tabelle 22: PCR-Befunde in Betrieb 4.

n.d. = nicht durchgeführt

Bei den Hennen des Betriebes 4 konnten Doppelinfektionen mit Astro- und Rotaviren über die gesamte Lebenszeit festgestellt werden. Vergleichbare Ergebnisse zeigten die Untersuchungen von Proben männlicher Tiere: Allerdings wurden bei einer Probe nur Astro- und bei einer anderen nur Rotavirus-RNA nachgewiesen. Die restlichen 5 Proben zeigten Doppelinfektionen.

Tabelle 23: PCR-Befunde in **Betrieb 5**.

Virus	Geschlacht		Putenalter (Wochen)										
Virus	Geschiecht	0-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	13-14	15-16	17-18	19-20		
Astrovirus	Ŷ	+	+	+	+	+	n.d.	+	+	n.d.	n.d.		
Rotavirus	Ŷ	+	+	+	+	+	n.d.	+	-	n.d.	n.d.		
Coronavirus	Ŷ	-	_	_	_	-	n.d	-	-	n.d	n.d		

n.d. = nicht durchgeführt

In Betrieb 5 wurden nur Hennen gehalten. In 6 von 7 der untersuchten Proben wurden Astro- und Rotavirus-RNA nachgewiesen. In der letzten vor der Schlachtung entnommenen Probe wurde lediglich Astrovirusgenom nachgewiesen.

Virus	Geschlecht		Putenalter (Wochen)										
Virus	Geschiecht	0-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	13-14	15-16	17-18	19-20		
Astrovirus	8	+	+	+	+	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
Astrovirus	Ŷ	+	+	+	+	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
Deterring	8	+	+	+	+	+	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
Rolavirus	Ŷ	+	+	+	+	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
Coropoviruo	8	_	_	-	-	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
Coronavirus	Ŷ	-	-	-	-	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		

Tabelle 24: PCR-Befunde in **Betrieb 6**.

n.d. = nicht durchgeführt

Bei den weiblichen Tieren konnten während der gesamten Haltungsdauer Doppelinfektionen mit Astro- und Rotaviren festgestellt werden. Auch bei den männlichen Tieren wiesen alle bis auf eine Probe (Hähne im Alter von 11 bis 12 Wochen) für beide Viren positive Ergebnisse auf.

Tabelle 25: PCR-Befunde in Betrieb 7.

Virus	Casablaabt		Putenalter (Wochen)										
Virus	Geschiecht	0-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	13-14	15-16	17-18	19-20		
Actrovinue	ð	+	+	+	+	+	+	+	+	n.d.	+		
Astrovirus	Ŷ	+	+	+	+	+	+	+	+	n.d.	n.d.		
Deterring	8	+	+	+	+	+	+	+	-	n.d.	+		
Rolavirus	Ŷ	+	+	+	+	+	+	+	-	n.d.	n.d.		
Sonstige	ð	-	-	-	-	-	-	-	-	n.d.	-		
(Adenovirus)	Ŷ	-	-	-	-	-	-	-	-	n.d.	n.d.		

n.d. = nicht durchgeführt

Bis auf eine Ausnahme waren alle Proben des Betriebes 7 Astro- und Rotavirus positiv. Bei den 15 bis 16 Wochen alten Tieren wurde lediglich Astrovirus-RNA nachgewiesen.

Virus	Geschlecht		Putenalter (Wochen)									
	Geschiecht	0-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	13-14	15-16	17-18	19-20	
Astrovirus	8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n.d.	
	Ŷ	+	+	+	+	+	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	
Rotavirus	8	+	+	-	+	+	-	+	+	+	n.d.	
	Ŷ	+	+	+	-	+	+	-	n.d.	n.d.	n.d.	
Sonstige (Adenovirus)	8	-	-	-	-	-	-	_	-	-	n.d.	
	Ŷ	-	-	-	-	-	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	

Tabelle 26: PCR-Befunde in Betrieb 8.

n.d. = nicht durchgeführt

Astroviren wurden in allen Proben des Betriebes 8 nachgewiesen, Rotaviren dagegen konnten in 12 von 16 untersuchten Proben gefunden werden.

3.2.2.2 Vergleichende Darstellung der PCR-Nachweise von Astro-, Rota- und Coronaviren in allen acht Betrieben

Der Nachweis von Coronaviren mittels RT-PCR verlief bei allen Proben negativ. Die Tabellen 27 und 28 geben eine Übersicht über die Anzahl positiver Virusnachweise in den jeweiligen Betrieben bei männlichen (Tabelle 27) und weiblichen Tieren (Tabelle 28).

Betrieb	Probenzahl	Astrovirus positiv	Rotavirus positiv
1	9	9	9
2	9	9	6
3	5	5	4
4	7	6	6
5	0*	0*	0*
6	6	6	5
7	9	9	8
8	9	9	7
Summe	54	53	45
Anteil posi	tiver Proben	98,2%	83,3%

Tabelle 27: Übersicht über die Anzahl von Virusnachweisen bei männlichen Tieren

* In Betrieb 5 wurden nur Hennen gehalten

Tabelle 28: Übersicht über	die Virusnachweise	mittels PCR bei	weiblichen Tieren

Betrieb	Probenzahl	Astrovirus positiv	Rotavirus positiv
1	7	7	7
2	7	7	4
3	5	5	5
4	6	6	6
5	7	7	6
6	6	6	6
7	8	8	7
8	7	7	5
Summe	53	53	46
Anteil positiver Proben		100,0%	86,8%

Die Daten aus den Tabellen 27 und 28 verdeutlichen eine beträchtliche Viruspräsenz in den untersuchten Proben. Die Zahl positiver Kotproben liegt für Rotaviren zwischen 83% (männliche Tiere) und 87% (weibliche Tiere) und für Astroviren zwischen 98% (männliche Tiere) und 100% (weibliche Tiere). Beim Vergleich beider Geschlechtsgruppen fällt auf, dass die Anzahl positiver Virusnachweise bei weiblichen und männlichen Tieren in etwa gleich ist (bei weiblichen Tieren um 2-3% höher als bei männlichen Tieren).

Eine Darstellung der Astro- und Rotavirus-Nachweise mittels PCR ohne Berücksichtigung der Geschlechter gibt Tabelle 29 wider.

Dotrich	Virus				Ρι	utenalte	er (Woo	chen)			
Dellieb		0-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	13-14	15-16	17-18	19-20
1	Astro	+	+	+	+	+	+	+	+	+	5
	Rota	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n.u.
2	Astro	+	+	+	+	+	+	+	+	nd	+
2	Rota	-	+	+	+	+	+	+	-	n.u.	+
3	Astro	+	+	+	+	+	nd	nd	nd	nd	n d
3	Rota	-	+	+	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
4	Astro	+	+	+	+	+	nd	+	nd	+	nd
4	Rota	+	+	+	+	+	n.u.	+	n.u.	-	n.u.
5	Astro	+	+	+	+	+	nd	+	+	nd	n d
5	Rota	+	+	+	+	+	n.u.	+	-	n.u.	n.u.
6	Astro	+	+	+	+	+	+	nd	nd	nd	nd
0	Rota	+	+	+	+	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
7	Astro	+	+	+	+	+	+	+	+	nd	+
/	Rota	+	+	+	+	+	+	+	-	n.u.	+
8	Astro	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n d
8	Rota	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n.u.

Tabelle 29: Übersicht über die PCR-Nachweise von Astro- und Rotaviren in allen acht Betrieben.

n.d. = nicht durchgeführt

Wie man der Übersicht aus Tabelle 29 entnehmen kann, waren alle acht Betriebe zu jedem Zeitpunkt der Probenahme Astrovirus positiv. Die Infektionsrate mit Rotaviren

war ebenfalls sehr hoch. Rotavirus negativ blieben lediglich Puten der Betriebe 2 und 3 in den ersten zwei Lebenswochen, Tiere der Betriebe 2, 5 und 7 in der 15.-16. Lebenswoche sowie Tiere des Betriebes 4 in der 17.-18. Lebenswoche.

3.2.3 Vergleich der elektronenmikroskopischen und molekularbiologischen Erregernachweise

Sowohl mittels TEM als auch mittels PCR konnten in zahlreichen Kotproben Astro- und Rotaviren nachgewiesen werden. Allerdings übertrifft die Nachweisquote der PCR die der TEM-Ergebnisse deutlich. Alle positiven TEM-Nachweise konnten mit Hilfe der PCR bestätigt werden. Abb. 10 sowie die Tabelle 30 zeigen eine vergleichende Übersicht zwischen elektronenmikroskopischem und molekularbiologischem Virusnachweis.

Tabelle 30: Übersicht über die mittels TEM- respektive PCR-Untersuchungen erhaltene
Anzahl positiver virologischer Befunde

		TE	EM		PCR					
	männlic	nnliche Tiere weibliche Tiere			männlic	he Tiere	weibliche Tiere			
Probenzahl	54		5	3	5	4	53			
Astrovirus positiv	15	27,8%	19	35,9%	53	98,2%	53	100,0%		
Rotavirus positiv	19	35,2%	26	49,1%	45	83,3%	46	86,8%		



Abb. 10: Vergleichende Darstellung von TEM und PCR-Ergebnissen

3.2.3.1 Sequenzierung von PCR-Produkten

Für jeden Betrieb wurde der entsprechende Genomabschnitt der in der PCR nachgewiesenen Astro- und Rotaviren sequenziert. Die dafür ausgewählten Proben stammten von 4 bis 6 Wochen alten Tieren, die zu diesem Zeitpunkt eine Doppelinfektion aufwiesen. Die Proben aus den Betrieben 5 und 8 wurden bei den Hennen entnommen. Bei allen anderen Betrieben handelt es sich um Proben von Hähnen. Die Ergebnisse der Sequenzvergleiche (Multiple Sequence Alignment) für Astro- und Rotavirusgensequenzen sind im Anhang 7.1 und im Anhang 7.2 zusammengestellt. Die Ähnlichkeit in der Nukleotidabfolge zwischen den Astrovirussequenzen (ORF1b) in den acht Betrieben lag zwischen 88% und 100%. Wenn man dieselben Sequenzen mit der Referenzsequenz (GQ301034.1) aus der NCBI-Genbank vergleicht, beträgt die Ähnlichkeit 87% bis 94%.

Die NSP4 Gensequenzen der Rotavirusisolate der acht Betriebe zeigten untereinander eine Ähnlichkeit von 97% bis 100%. Beim Vergleichen dieser Sequenzen mit der NCBI-Referenzsequenz (AY062937.1) wurde eine Ähnlichkeit von 94% bis 97% festgestellt. Zur Erstellung phylogenetischen Stammbäume wurden die Gensequenzen der Isolaten Rota- und Astroviren aus den 8 untersuchten Betrieben unter verwendung der Parismony Methode mit jeweils 3 weiteren Referenzsequenzen verglichen. Abbildungen 14 und 15 geben ein Eindruck über die Verwandschaftsbeziehungen zwischen den Virusstämmen.



0.005

Abb. 11: Phylogenetischer Baum der Astrovirus ORF1b Sequenzen



Abb. 12: Phylogenetischer Baum der Rotavirus NSP4 Sequenzen

3.2.4 Salmonellennachweis

Es wurden 107 Kotproben mittels Anreicherungsverfahren auf Salmonellen untersucht. Der Salmonellennachweis verlief bei allen Proben negativ.

3.2.5 Parasitologische Untersuchungen

Es wurden 107 Kotproben parasitologisch mittels Flotationsverfahren untersucht. In zahlreichen Proben konnten Kokzidienoozysten nachgewiesen werden. Die Untersuchungsergebnisse der einzelnen Betriebe sind in Tabelle 31 zusammengefasst. Außer Kokzidienoozysten wurden keine weiteren Parasiten oder Parasiteneier gefunden.

In allen untersuchten Betrieben konnten Kokzidienoozysten nachgewiesen werden. Bis zur 2. Lebenswoche verlief der Nachweis auf Kokzidienoozysten bei allen Proben negativ. In den Lebenswochen 3 bis 8 war allerdings betriebsabhängig ein besonders starker Befall mit bis zu über 100 Kokzidienoozysten pro Gesichtsfeld in 6 von 8 Betrieben festzustellen. Ab der 9. Lebenswoche reduzierte sich mit Ausnahme von Betrieb 2 und 3 die Kokzidienmenge auf 1 bis 3 pro Gesichtsfeld.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 30 zusammengefasst.

Detrich	Caaablaabt		Putenalter (Wochen)									
Detheb	Geschiecht	0-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	13-14	15-16	17-18	19-20	
1	5	-	-	++++	+	-	+	+	+	+	n.d.	
1	\$	-	-	++	+++	+	+	++	n.d.	n.d.	n.d.	
0	5	-	-	-	+	-	-	+	-	n.d.	+	
2	9	-	-	-	-	-	++	+	n.d.	n.d.	n.d.	
2	5	-	-	-	+++	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
3	9	-	-	-	+++	++	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
4	5	-	++	++	-	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	
4	9	-	++	+	-	-	n.d.	-	n.d.	n.d.	n.d.	
5	4	-	+++	+++	-	+	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	
6	5	-	-	+++	+	+	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
0	0 +	-	-	+++	+	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
7	5	-	-	+	+	+	-	+	+	n.d.	+	
7	9	-	+	+	-	+	+	+	+	n.d.	n.d.	
0	8	-	++++	+	+	+	-	+	-	+	n.d.	
8	9	-	++++	+	+	+	+	-	n.d.	n.d.	n.d.	

Tabelle 31: Ergebnisse der parasitologischen Untersuchungen auf Kokzidien bei Puten.

+ \triangleq 1-3; ++ \triangleq 4-20; +++ \triangleq 21-100; ++++ > 100 Kokzidienoozysten pro Gesichtsfeld n. d. = nicht durchgeführt

3.2.6 Untersuchungsbegleitende Datenerhebung

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Informationen über den Gesundheitsstatus der Putenbetriebe sowie die wichtigen Wirtschaftsparameter wurden durch die Putenhalter selbst erfasst und uns zur Verfügung gestellt.

3.2.6.1 Klinische Erscheinungen bei Tieren

Die in den Untersuchungsanträgen vermerkten Durchfälle zum Zeitpunkt der Probenahme sind in der Tabelle 32 zusammengefasst. Bei der Auswertung dieser Daten muss berücksichtigt werden, dass die registrierten Erkrankungsfälle nicht aufgrund einer tierärztlichen Diagnose erhoben wurden, sondern allein auf den Beobachtungen der Tierhalter basieren.

Detrich				Р	utenalter	(Woche	n)			
Dellieb	0-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	13-14	15-16	17-18	19-20
1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	n.d.
2	+	-	-	+	-	-	-	-	n.d.	-
3	-	-	-	+	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4	+	-	+	-	+	n.d.	-	n.d.	-	n.d.
5	-	-	+	-	+	n.d.	-	-	n.d.	n.d.
6	-	-	+	-	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
7	+	+	-	-	-	-	-	+	n.d.	-
8	+	-	+	-	-	+	-	-	-	n.d.

Tabelle 32: Zusammenfassung der berichteten Durchfälle bei den Puten in den beprobten Betrieben.

In Abb. 13 werden vergleichend die Nachweise von Durchfallerregern sowie die in den Betrieben registrierten Durchfälle dargestellt.





3.2.6.2 Wirtschafts- und Haltungsparameter

Am Ende der jeweiligen Mastperiode von Hähnen und Hennen wurde uns das durchschnittliche Gewicht der Tiere vor dem Schlachten sowie die gesammte Futterverwertung und Mortalitätsrate mitgeteilt. Da aus Betrieb 6 keine Ergebnisse zu diesen Parameter zur Verfügung gestellt wurden, konnten diese Daten lediglich aus 7 Betrieben erhoben werden (siehe Tab. 33 und 34).

Die Auswertung der Wirtschaftsparameter von männlichen Tieren nach der 21wöchigen Mastperiode zeigt, dass das Lebendgewicht vor dem Schlachten in allen 6 erfassten Betrieben über 20 kg lag. Der Unterschied zwischen dem niedrigsten und dem höchsten Wert betrug 1,89 kg.

Die Mortalität unter den Hähnen schwankte von 7,0 bis 11,43%

Betrieb	Schlachtalter (Wochen)	Lebendgewicht am Ende der Mast (kg)	Futterverwertung*** (kg Futter pro kg Fleisch)	Mortalität (%)
1	21	22,19	2,77	7,0
2	21	22,24	2,73	9,67
3	21	21,86	2,73	10,1
4	21	20,84	2,66	7,8
5*	-	-	-	-
6**	KA	KA	KA	KA
7	21	21,8	2,7	11,43
8	21	20,35	2,8	9,1

Tabelle 33: Übersicht über die Wirtschafts- und Haltungsparameter bei den Hähnen.

* in Betrieb 5 wurden nur Hennen gehalten

** in Betrieb 6 liegen keine Agaben vor

*** Die Futterferwertung wurde als gesammte Futterverwertung von Hennen und Hähnen zusammengefasst Die Mastperiode bei Hennen dauerte nur 15 Wochen. Das Lebendgewicht der Tiere verschiedener Betriebe vor dem Schlachten lag zwischen 9,5 und 10,78 kg. Die Mortalität bei Hennen war niedriger als bei Hähnen und lag zwischen 2,6 und 6,3%. Die Futterverwertung in allen Betrieben unterschied sich nur geringfügig (2,66-3,0 kg Futter pro kg Fleisch)

Betrieb	Schlachtalter (Wochen)	Lebendgewicht am Ende der Mast (kg)	Futterverwertung** (kg Futter pro kg Fleisch)	Mortalität (%)
1	15	10,58	2,77	2,7
2	15	10,59	2,73	2,65
3	15	10,42	2,73	3,4
4	15	10,3	2,66	2,6
5	15	9,5	3,0	5,6
6*	KA	KA	КА	KA
7	15	10,78	2,7	5,26
8	15	10,04	2,8	6,3

Tabelle 34: Übersicht über die Wirtschafts- und Haltungsparameter bei den Hennen.

* in Betrieb 6 liegen keine Angaben vor

** Futterverwertung wurde mit Ausnahme von Betrieb 5 als gesammte Futterverwertung von Hennen und Hähnen zusammengefasst

4 Diskussion

Durchfallerkrankungen bei Mastputen stellen aufgrund hoher Morbiditäts- und Mortalitätsraten und den damit verbundenen wirtschaftlichen Einbußen ein massives Problem für die betroffenen Bestände dar (Barnes et al., 2000). Deshalb kommt vor allem bei akuten Durchfallerkrankungen der raschen Diagnostik möglicher infektiöser Ursachen eine besondere Bedeutung zu. Hauptursache von Durchfallerkrankungen bei Puten sind virale Einzel- oder Mischinfektionen, welche in vielen Fällen auch eine wichtige Rolle als Wegbereiter für bakterielle und parasitäre Sekundärinfektionen spielen, wie z. B. im Rahmen des Puten-Enteritis-Komplexes (Poult Enteritis Complex, PEC) (Barnes et al., 2000; Guy, 1998). Während Bakterien und Parasiten als Ursache von Durchfallerkrankungen mit relativ geringem Aufwand diagnostiziert werden können, stellt sich die Diagnostik viraler Infektionen nach wie vor ungleich schwieriger dar. Aus diesem Grunde gibt es bislang nur sehr wenige in der Routinediagnostik etablierte Methoden, mit denen virale Enteritiserreger erfasst werden können. Da Untersuchungen auf enterale Viren bei Puten in zu geringem Umfang in die Routinediagnostik eingebunden sind, wird der Bedeutung dieser Virusinfektionen noch zu wenig Beachtung geschenkt. Dem entgegen steht eine stark angestiegene Nachfrage nach Untersuchungen von Putenkotproben auf enterale Viren am CVUA Stuttgart. Die Untersuchungen solcher Proben wurden allerdings erst mit der Einführung der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) im Jahre 2005 möglich, wodurch das Spektrum der Diagnostik viraler Infektionskrankheiten enorm erweitert werden konnte. Der Schwerpunkt der vorliegenden Studie liegt auf dem Nachweis von enteralen Viren mittels TEM. Darüber hinaus sollte der Blick auch in die Zukunft und somit auf neuartige Methoden wie die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) gerichtet werden, weshalb der Entwicklung, Etablierung und Anwendung dieser Methodik ebenfalls breiter Raum eingeräumt wurde.

Ziel dieser Arbeit war es, Viren des Puten-Enteritis-Komplexes (PEC), dazu gehören Astro-, Rota- und Coronaviren, in Sammelkotproben von Mastputen mittels TEM als Standardmethode vergleichend mit selbst entwickelten sowie bereits beschriebenen PCR-Methoden zu untersuchen. Mit Hilfe dieser Methoden sollten erstmals umfang-reichere Daten zum Vorkommen, zur Dauer der Ausscheidung während der Mastperiode sowie zur Bedeutung der drei genannten enteralen Viren in Putenmastbetrieben in Baden-Württemberg gewonnen werden. Da einerseits besonders Jung-tiere von Durchfallerkrankungen betroffen sind (Hafez und Jodas, 1997; Woolcock und Shivaprasad, 2008; Jindal et al., 2009), oftmals verbunden mit hoher Morbidität und

teilweise auch Mortalität, und andererseits eine Ausscheidung von enteralen Viren über einen langen Zeitraum hinweg in vorherigen Studien nachgewiesen werden konnte (Villarreal et al., 2006), erstreckte sich der Beprobungszeitraum für diese Studie über die gesamte Mastperiode von 15 (Hennen), respektive 21 Wochen (Hähne). Ausgewählt wurden für dieses Projekt acht Putenbestände unterschiedlicher Größe (von 10300 bis 31800 Tiere), in denen bereits im Vorfeld bei Routineuntersuchungen mittels TEM Rota- und/oder Astroviren nachgewiesen worden waren.

4.1 Beurteilung der elektronenmikroskopischen Befunde

Die Elektronenmikroskopie stellt eine universelle, bildgebende, direkte Nachweismethode für Viren in unterschiedlichsten Probenmaterialien dar. Der offene Blick dieser Untersuchungsmethode ermöglicht die Entdeckung und morphologische Beurteilung aller in einer Probe vorhandenen Mikroorganismen und bietet damit große Vorteile gegenüber vielen anderen angewandten Methoden, die sehr spezifisch auf einen bestimmten Erreger ausgerichtet sind und damit eine eingeschränkte Aussagekraft haben.

Obwohl die visuelle Darstellung von Viren mittels TEM zeitaufwändiger als beispielsweise der molekularbiologische Nachweis ist und darüber hinaus spezielle Kenntnisse für die Probenpräparation und Auswertung erfordert, ermöglicht diese Methode den Nachweis des gesamten Spektrums an Viren in nur einem Präparationsansatz bei angemessenem Aufwand. Ein weiterer Vorteil der TEM liegt hierbei in der vergleichsweise kurzen Untersuchungsdauer (< 1 h).

Besonders erfolgreich kann die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) bei Virusinfektionen mit hoher Erregerpräsenz, zum Beispiel während einer akuten Infektion, eingesetzt werden (Palmer und Martin, 1988). Enterale Virusinfektionen zeichnen sich durch die Ausscheidung großer Erregermengen im Kot aus und bieten somit gute Voraussetzungen für den visuellen Nachweis und die Differenzierung der Viruspartikel aufgrund spezifischer morphologischer Merkmale (Doane und Anderson, 1987; Madeley und Field, 1988). Darüber hinaus kann bei Proben mit geringerer Viruskonzentration mittels Ultrazentrifugation eine deutliche Virusanreicherung erzielt werden, wodurch die Nachweisgrenze um bis zu 2 Zehnerpotenzen gesteigert werden kann (Laue und Bannert, 2010). Dies ermöglicht es, die TEM bei überschaubaren Probenzahlen auch in der Routinediagnostik als rasch und universell anwendbare Methode zu etablieren.

Mit Hilfe des Transmissionselektronenmikroskops gelingt es dem erfahrenen Betrachter bei ausreichend guter Probenqualität, eine Vielzahl unterschiedlicher Viren ihren Familien (z.B. Reoviren) und oftmals auch dem Genus (z.B. Rotavirus) sicher zuzuordnen. Neben der Identifizierung bekannter Viren, die im Rahmen von Monooder Mischinfektionen erkannt werden können, ist es darüber hinaus auch möglich, neue und bislang unbekannte Viren zu entdecken (Guy, 1998; Tang et al., 2005). Somit bietet sich die TEM als ideales Instrument sowohl für die Einzeltierdiagnostik als auch für Monitoringuntersuchungen auf Bestandsebene an (Woolcock und Shivaprasad, 2008).

Um für die vorliegende Studie einen Überblick über das Infektionsgeschehen in den acht untersuchten Beständen zu bekommen, wurden zunächst Sammelkotproben aus jedem Stall für ein umfassendes Screening herangezogen, wie es auch von Teixerira et al. (2007) empfohlen wird. Die Probenmatrix wurde ausgewählt, da im Vordergrund nicht die Einzeltierdiagnostik, sondern der Gesamtbestand als die vom behandelnden Tierarzt zu betreuende Einheit stand. Dieser Ansatz führt zu einer erheblichen Verringerung der Probenanzahl bei gleichzeitig hoher Aussagekraft der Laborergebnisse und lässt somit den Untersuchungsaufwand zugunsten einer raschen umfassenden ätiologischen Diagnose in den Hintergrund treten.

Als Resultat konnten in ca. 42% aller Proben Rota- sowie in ca. 32% aller Proben Astroviren nachgewiesen werden. Diese hohen Nachweisraten für die genannten Viren im Putenkot bestätigen die Ergebnisse früherer Studien. Während bei Woolcock et al. (2008) von 1800 retrospektiv bewerteten Darmproben 46% als "Rotavirus-like"-positiv beurteilt wurden und bei Jindal et al. (2009, 2010) in 48% von 151 untersuchten Proben bzw. in 58% von 43 Proben Rotaviren nachgewiesen werden konnten, gelang dies Tang et al. (2005) sogar bei 96% der 319 untersuchten Proben. Da in zahlreichen früheren elektronenmikroskopischen Untersuchungen positive Astrovirusbefunde nicht mittels molekularbiologischer Verfahren bestätigt werden konnten, wurden diese Viren oftmals lediglich als "Small Round Viruses" (SRV) bezeichnet. Dennoch stimmen auch hier die Untersuchungsergebnisse mit 32% (Tang et al., 2005), 39% (Woolcock und Shivaprasad, 2008), 30% (Jindal et al., 2010) und 17% (Jindal et al., 2009) mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie weitgehend überein. Ein hoher Anteil Coronavirus-positiver Proben, wie er von Tang et al. (2005) festgestellt wurde, konnte sowohl in der vorliegenden Studie als auch von Jindal et al. (2009) nicht bestätigt werden. Diese starken Abweichungen der Ergebnisse könnten ihre Ursache in Fehlinterpretation von Zellmembranfragmenten als Coronaviren haben (Woolcock und Shivaprasad, 2008).

Adenoviren konnten in der vorliegenden Arbeit bei 13% der Proben nachgewiesen werden. Da diese Viren lediglich bei Puten ab einem Alter von über 5 Wochen nachweisbar waren und die Tiere aller acht Betriebe in der 4. Lebenswoche mit einer
Lebend-Vaccine über das Trinkwasser immunisiert wurden, muss von einem Nachweis des Impfviruses ausgegangen werden. Dies entspricht auch den Beobachtungen einer Studie von Pantin-Jackwood et al. (2007), in welcher der Nachweis von Adenoviren in acht untersuchten Putenhennen-Betrieben ebenfalls erst 1,5 Wochen nach der Impfung gelang.

Ein Vergleich der Virusnachweise bei männlichen respektive weiblichen Putenherden zeigt, dass bei den Hennen der Anteil positiver Proben jeweils höher liegt (49% Rotavirus- und 36% Astrovirus-positiv) als bei den Hähnen (35% Rotavirus- und 28% Astrovirus-positiv).

Beurteilt man die Anzahl der Virusnachweise von Rota- und Astroviren über den gesamten Mastzeitraum, so erkennt man, dass der Anteil der positiven Virusnachweise in den ersten 10 Lebenswochen mit 77% deutlich höher lag als in der zweiten Hälfte der Mastzeit (ca. 38% positive Virusnachweise). Ähnliche Verläufe der Virusausscheidung konnten auch in früheren Studien festgestellt werden (Pantin-Jackwood et al., 2007; Woolcock und Shivaprasad, 2008)

4.2 Beurteilung der PCR-Befunde

PCR-Methoden sind auf den Nachweis einer bestimmten Virusart, eines bestimmten Virustyps oder Virussubtyps festgelegt und zeichnen sich somit durch eine hohe Spezifität aus. Dies begrenzt zwar das Spektrum nachweisbarer Viren pro PCR-Test, ermöglicht aber im Gegensatz zur TEM eine weitaus differenziertere Diagnostik. Auf die im Vergleich zur TEM höhere Sensitivität von PCR-Methoden ist bereits in zahlreichen Arbeiten hingewiesen worden (Guy, 2008; Jindal et al., 2010; Sellers et al., 2004; Tang et al., 2005).

Um die elektronenmikroskopischen Ergebnisse dieser Studie mit molekularbiologischen Methoden verifizieren und deren jeweilige Aussagekraft miteinander vergleichen zu können, wurden PCR-Verfahren angewandt, welche Astro-, Rota- oder Coronaviren bei Puten nachweisen können. Um eine möglichst große Vielzahl der bereits in die NCBI-Bank aufgenommenen Virusisolate detektieren zu können, wurden für das jeweilige Primerdesign der Rota- bzw. Astrovirus-PCR übereinstimmende DNA-Sequenzen konservierter Gene aus der NCBI-Datenbank herangezogen. Hierfür wurden, wie bereits beschrieben, Sequenzen des ORF1b-Segments des Astrovirusgenoms (Koci et al., 2000a; Tang et al., 2005) sowie des NSP4-Abschnitts des Rotavirusgenoms (Day et al., 2007; Pantin-Jackwood et al., 2007) verwendet. Lediglich das PCR-Verfahren zum Nachweis der Putencoronaviren wurde der Literatur entnommen (Cavanagh et al., 2001), da zu Beginn des Projektes keine Positivkontrolle für dieses Virus zur Verfügung stand und somit keine ausreichende Verifizierung einer neu entwickelten Methode möglich gewesen wäre. Deshalb wurde als Positivkontrolle für die Putencoronaviren-PCR wie auch von anderen Autoren beschrieben, ein Impfstamm des Infektiösen Bronchitis-Virus ausgewählt, welches ebenfalls der Familie Coronaviridae zuzuordnen und mit dem Putencoronavirus eng verwandt ist (Culver et al., 2006b; Villarreal et al., 2006).

Aus jedem der acht Bestände wurde zum Zweck der Verifikation der PCR-Methoden jeweils ein Amplifikat einer positiven Rotavirus- bzw. Astrovirus-PCR sequenziert, um anschließend die Sequenzen dieser Isolate untereinander sowie mit anderen Sequenzen aus der NCBI-Datenbank vergleichen zu können. Darüber hinaus konnte mit Hilfe dieser DNA-Sequenzen auch nachgewiesen werden, dass die Primerbindenden Sequenzen der einzelnen Isolate aus den acht Beständen für die jeweilige Virusart homolog sind und keine SNIPs (Single-Nucleotide Polymorphism) zeigten.

Während in allen Betrieben sowohl bei den Hähnen als auch bei den Hennen zu fast jedem Zeitpunkt Rota- und Astroviren nachgewiesen werden konnten, war der Nachweis von Puten-Coronaviren bei keiner der Proben möglich. Auch Lojkic et al. (2010) konnten bei 23 Proben von Tieren mit PEC keine Coronaviren nachweisen. Dem entgegen deuten die Untersuchungen von Culver et al. (2006b) mit 16 positiven von 84 Proben zumindest auf eine Mitbeteiligung der Coronaviren beim Durchfallgeschehen bei Puten hin.

Die Funktionalität der verwendeten Corona-PCR (Cavanagh et al., 2001) konnte im Verlauf der Untersuchungen durch eine Putencoronavirus-positive Probe aus einem Bestand außerhalb dieser Studie bewiesen werden, und in einer Studie von Teixerira et al. (2007) wurde darüber hinaus gezeigt, dass Kot- und Darmproben die beste Probenmatrix für den Nachweis von Coronaviren bei PEC darstellen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Tiere der acht untersuchten Bestände tatsächlich nicht mit Putencoronaviren infiziert waren.

Die Nachweisraten von Rota- (85%) und Astroviren (99%) mittels PCR-Untersuchungen lagen deutlich höher als die der elektronenmikroskopischen Untersuchungen. Dennoch zeigte sich auch hier wieder eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Autoren. Während die Nachweisraten Rotavirus-positiver Darmproben in anderen Studien zwischen 68% (Pantin-Jackwood et al., 2007) und 93% (Jindal et al., 2010) lagen, konnten bei 90% (Pantin-Jackwood et al., 2007; Pantin-Jackwood et al., 2006a), 84% (Jindal et al., 2010) bzw. 73% (Lojkic et al., 2010) der Darmproben von Puten Astroviren nachgewiesen werden. Lediglich bei Culver et al.(2006b) lag der prozentuale Nachweis von Astroviren mit 38% deutlich niedriger.

Vergleich der DNA-Sequenzen der amplifizierten NSP4-Abschitte Ein des Rotavirusgenoms ergab eine Nukleotidähnlichkeit von über 97% zwischen den acht Isolaten der vorliegenden Studie sowie von 94% bis 97% bei Einbeziehung bekannter Sequenzen aus der NCBI-Bank. Dies entspricht weitgehend den Zahlen von Jindal et al. (2010), der bei 43 Proben von Puten mit PEC eine Sequenzübereinstimmung im NSP4-Genom von über 93% feststellte. Der Vergleich zu weiteren Seguenzen aus der NCBI-Genombank zeigte in seiner Studie eine Nukleotidähnlichkeit zwischen 90% und 100%. Eine geringfügig verminderte Nukleotidähnlichkeit konnte bei den Astroviren festgestellt werden. Sowohl in der vorliegenden Studie als auch bei Pantin-Jackwood et al. (2006) und Jindal et al. (2010) wurde als Zielgen das ORF1b-Segment des Astrovirusgenoms ausgewählt, welches für die RNA-abhängige RNA-Polymerase codiert. In der vorliegenden Studie lag die Nukleotidähnlichkeit bei über 88%, und sowohl Pantin-Jackwood et al. (2006) als auch Jindal et al. (2010) konnten eine Übereinstimmung von mindestens 86% innerhalb der Isolate der Probenpools feststellen. Bezieht man auch hier die Genomsequenzen aus der NCBI-Genombank in den Vergleich mit ein, so kann sowohl bei den Seguenzen unserer Studie als auch bei denen von Jindal et al. (2010) eine Übereinstimmung von mindestens 85% festgestellt werden. Insgesamt spricht dies dafür, dass die Zielgene der entwickelten PCR-Verfahren hoch konserviert und somit zum Nachweis für eine große Anzahl verschiedener Rota- und Astrovirus-Feldisolate geeignet sind.

Der Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Tieren bei den Virusnachweisraten fiel bei den PCR-Untersuchungen deutlich geringer aus, als dies bei der Elektronenmikroskopie der Fall war. Während 98% der Proben von männlichen sowie 100% der Proben von weiblichen Tieren positiv in der Astrovirus-PCR waren, lagen die Nachweisraten bei den Rotaviren zwischen 83% (Hähne) und 87% (Hennen).

Ein deutlicher Abfall der Nachweisraten beider Viren, wie er mittels elektronenmikroskopischer Diagnostik ab einem Lebensalter von ca. 6 Wochen zu beobachten war, konnte mittels PCR nicht gezeigt werden. Dies wird in Abb. 14 deutlich, welche vergleichend die Daten dieser Studie und die eingebundenen Daten von Pantin-Jackwood (2007) darstellt.

Die Ergebnisse dieser Studie decken sich mit den Beschreibungen anderer Autoren, die einerseits mittels Elektronenmikroskopie einen deutlichen Rückgang der Nachweishäufigkeit von Rota- und Astroviren ab der 6. Lebenswoche beobachteten (Woolcock und Shivaprasad, 2008), während andererseits der Nachweis dieser Viren mittels PCR-Verfahren über einen Zeitraum von 10 Wochen fast unverändert blieb (s.Abb. 14). (Pantin-Jackwood et al., 2007) Abb. 14: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse aus der vorligenden Srudie (TEM/PCR) zum Nachweis von Astroviren (A) und Rotaviren (B) im Kot von Puten aus 8 verschiedenen Betrieben mit den PCR Ergebnissen einer Studie von Pantin-Jackwood (2007).



4.3 Beurteilung der bakteriologischen und parasitologischen Befunde

Während die Untersuchungen der 107 Kotproben auf Salmonellen ausschließlich negative Ergebnisse erbrachten, konnten in zahlreichen Proben Kokzidien nachgewiesen werden. Insgesamt 54% aller untersuchten Proben enthielten Kokzidienoozysten. Eine retrospektive Studie von Jindal et al. (2009) ergab bei 151 untersuchten Darmproben mit 29% Kokzidien-positiven Proben vergleichsweise etwas niedrigere Werte. Die Infestationsrate lag bei den Hennen (58%) wiederum höher als bei den Hähnen (50%). Nachdem in der vorliegenden Studie in den ersten 2 Lebenswochen bei keiner der Proben ein Kokzidiennachweis gelang, kam es ungefähr ab der 3. Lebenswoche zu einem deutlichen Anstieg der Nachweisrate in den Beständen sowie der Kokzidienzahl in den einzelnen Proben. Der Höhepunkt des Kokzidiennachweises lag zwischen der 5. und 8. Lebenswoche, wonach es dann in den folgenden Wochen infolge einer Behandlung gegen Kokzidien (Hafez, 2008; Paeffgen et al., 1988) wieder zu einer deutlichen Reduktion der Kokzidienausscheidung kam. Ab der 9. Lebenswoche konnten nur noch vereinzelt Kokzidienoozysten festgestellt werden (s. Abb. 13).

4.4 Beurteilung der untersuchungsbegleitenden Daten

Bei der Beurteilung der klinischen Erscheinungen in den Putenmastbeständen muss berücksichtigt werden, dass diese lediglich vom Tierhalter selbst und nicht von einem Tierarzt festgestellt wurden. Da es sich bei den Teilnehmern dieser Studie um Tierhaltern mit großer Erfahrung in der Putenmast handelt, kann jedoch davon ausgegangen werden, dass diese Beobachtungen weitestgehend der Realität entsprachen. Um klinische Symptome zu evaluieren, wurde auf den zugesendeten Fragebögen gezielt nach Durchfällen gefragt. Im Verlauf der gesamten Mastperiode konnten Durchfälle in jedem der acht untersuchten Bestände mindestens einmal beobachtet werden. Bei 16 Probeneinsendungen wurden von den Tierhaltern auf dem Fragebogen Durchfallgeschehen vermerkt. Diese traten in acht Fällen zeitgleich mit dem Nachweis von Viren (Rotaviren und/oder Astroviren) und Kokzidien auf. In vier Fällen konnten während des Durchfallgeschehens lediglich Viren, in zwei Fällen ausschließlich Kokzidien nachgewiesen werden. Setzt man die Häufigkeit des Auftretens von Durchfällen in Relation zu den Erregernachweisen, so lässt sich ein Maximum sowohl der Erregernachweise als auch der klinischen Fälle in der 6. Lebenswoche beobachten (s. Abb. 13). Bemerkenswert ist das Auftreten von Durchfällen in der Hälfte aller Bestände bereits in der 2. Lebenswoche, also zu einem Zeitpunkt, an dem noch keine Kokzidienoozysten nachgewiesen werden konnten, aber bereits in den meisten der Bestände der

Nachweis von Rota- und/oder Astroviren gelang. Hier muss ein ausschließlich auf Viren zurückzuführendes Durchfallgeschehen in Betracht gezogen werden.

4.5 Beurteilung der Leistungsparameter

Ein Vergleich der Leistungsparameter zeigt, dass das Schlachtgewicht und die Futterverwertung sowohl der Hähne als auch der Hennen bei fast allen Beständen in einem sehr eng umrissenen Bereich liegen. Lediglich Betrieb 5 (nur Hennen) zeigte eine leicht verminderte Futterverwertung bei gleichzeitig geringfügig erhöhter Mortalität. Ebenfalls leicht erhöhte Mortalitätsraten waren bei den weiblichen Tieren der Betriebe 7 und 8 sowie bei den Hähnen der Betriebe 2, 3, 7 und 8 zu finden. Insgesamt lagen aber sowohl die Schlachtgewichte als auch die Futterverwertungs- und Mortalitätsparameter in dem auch von anderen Autoren (Aviagen Turkeys Ltd., 2009) genannten Referenzbereich. Einen direkten Bezug zwischen Mortalitätsraten, wie sie auf den Fragebögen von den Putenhaltern berichtet wurden, und den Erregernachweisen herzustellen, sei weiterführenden Studien vorbehalten.

4.6 Beurteilung der Methoden

Bei einer retrospektiven Betrachtung und Beurteilung der angewandten Methoden sollte zunächst noch einmal der Fokus der durchgeführten Studie vor Augen geführt werden. Vor deren Beginn gab es lediglich Hinweise aus vorangegangenen Routineuntersuchungen auf das Vorhandensein von Rota- und/oder Astroviren in den einzelnen Beständen. Ob darüber hinaus auch andere virale Erreger eine Rolle spielen könnten, war zu diesem Zeitpunkt unklar. Dies bedeutet, dass zunächst eine Methode ausgewählt werden musste, welche für ein breites Screening von Erregern, deren Ausscheidung in großen Mengen zu erwarten ist, und für eine überschaubare Anzahl von Proben geeignet ist. Für solch eine Zielsetzung bietet sich die elektronenmikroskopische Diagnostik mittels TEM an (Doane und Anderson, 1987; Gelderblom et al., 1991), auch wenn deren Sensitivität ohne zusätzliche Aufkonzentrierungsverfahren nicht sehr hoch ist. Die konventionelle PCR und in noch größerem Maße die Real-Time PCR, ermöglichen einen weitaus sensitiveren Virusnachweis als die TEM (Akimkin et al., 2011). Darüber hinaus ist mittels Real-Time PCR nicht nur ein quantitativer Virusnachweis mit Bezug auf eine Nachweisgrenze, sondern auch eine absolute Erregerquantifizierung möglich (gPCR). Einen Überblick über eine vergleichende Bewertung der genannten Methoden gibt Tabelle 35.

Untersuchungsfokus	Untersuchungsmethode		
	ТЕМ	Konventionelle PCR	Real-Time-PCR
gezielte Untersuchung Einzelproben	+	+++	+++
Screening ¹ Einzelproben	+++	+	++ ²
gezielte Untersuchung Massenproben	-	++	+++
Screening ¹ Massenproben	++	-	+2

Tabelle 35: Vergleich der Eignung von Elektronenmikroskopie (TEM), konventioneller PCR und Real-Time PCR für den Nachweis enteraler Viren im Kot von Puten.

¹ Untersuchung einer unbekannten Probe auf verschiedene Erreger

² z.B. mittels Multiplex-PCR

Betrachtet man die beiden in der vorliegenden Studie angewandten Methoden auf ihre Relevanz bezüglich der klinischen Beobachtungen, so korrelieren lediglich die elektronenmikroskopischen Ergebnisse zeitlich mit den beobachteten Enteritiden. Ursächlich hierfür könnte sein, dass die wesentlich sensitivere PCR-Methode auch schon geringe Erregermengen detektiert, wie sie z. B. bei einer niedrigen Viruslast im frischen Kot oder bei noch im Stall vorhandenen Kotresten vorkommen können, so dass die Ergebnisse dieser Methode fast über die gesamte Mastperiode positiv verliefen. Methode der Wahl im Falle einer gezielten Untersuchung auf bestimmte Viren wäre somit die Real-Time-PCR (Akimkin et al., 2011), mit der unter Verwendung eines zuvor erstellten Mengenstandards sehr exakte quantitative Aussagen möglich wären.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch den gezielten, kombinierten Einsatz von TEM und PCR in der Diagnostik die Potenzierung der Vorteile beider Methoden möglich ist. Während die Stärken der TEM im Erkennen des gesamten Spektrums von Virusgruppen liegt, kann die PCR nach Eingrenzung des Spektrums auf bestimmte Viren für eine sensitivere und differenziertere Diagnostik eingesetzt werden. Für beide Methoden haben sich Untersuchungen von gepoolten Kotproben für Bestandsdiagnosen als gleichermaßen geeignet erwiesen.

4.7 Schlussfolgerungen

- Bei diagnostischen Untersuchungen von Putenbeständen mit Durchfallgeschehen sollten neben parasitären und bakteriellen Infektionserregern immer auch Viren miteinbezogen werden, was die hohen Nachweisraten von Rotaund Astroviren in Putenbeständen in Baden-Württemberg beweisen.
- Kotproben sind f
 ür den Nachweis von Viren als Ursache akuter Durchfallerkrankungen in Putenbest
 änden mittels Elektronenmikroskopie oder PCR geeignet.
- Während der Vorteil der Elektronenmikroskopie in einem generellen Nachweis von Viren in einem einzigen Präparationsansatz pro Kotprobe liegt, ist als Vorteil der PCR der sensitive Nachweis auch geringer Virusausscheidungen zu nennen.
- Die maximale Anzahl von Betrieben mit Durchfallgeschehen sowie der Höhepunkt des Nachweises von Kokzidien, Rota- und Astroviren fielen zeitlich zusammen, was auf einen kausalen Zusammenhang schließen lässt.
- In der 2. Lebenswoche traten in der Hälfte aller Bestände Enteritiden auf, die nicht auf Kokzidien zurückgeführt werden konnten, jedoch aber mit hohen Nachweisraten an Rota- und Astrovirus assoziiert waren.

4.8 Ausblick

- Um Aussagen über die Prävalenz von Rota- und Astroviren machen zu können, sollten weiterführende epidemiologische Studien mit zufällig ausgewählten Beständen durchgeführt werden.
- Um einen Bestand mit einer möglichst sensitiven Methode gezielt auf bestimmte Viren untersuchen und gleichzeitig eine quantitative Aussage über die momentan ausgeschiedene Erregermenge machen zu können, bietet sich der Einsatz der Real-Time-PCR unter Mitführung eines Mengenstandards an.
- Sollten sich in weiterführenden epidemiologischen Untersuchungen die hohen Prävalenzen von Rota- und Astroviren in den Putenbeständen bestätigen, wird die Entwicklung und Herstellung von Impfstoffen zur Prophylaxe von Durchfällen empfohlen.

5 Zusammenfassung

Durchfallerkrankungen gehören zu den bedeutsamsten Erkrankungen bei Puten und verursachen weltweit hohe wirtschaftlichen Verluste. Als Krankheitsauslöser werden verschiedene Infektionserreger wie Viren, Bakterien und Parasiten vermutet, welche entweder allein oder in Mischinfektionen vorkommen. Oftmals wird der Krankheitsverlauf auch durch nicht infektiöse Ursachen wie Fütterungs- und Haltungsfehler negativ beeinflüsst. Aufgrund des multikausalen Charakters von Darmerkrankungen sind die primären Durchfallursachen häufig nur schwer zu ermitteln.

Unter den viralen Erregern gelten Astro-, Rota- und Coronaviren als darmpathogen. In Deutschland gab es bislang keine Daten zum Vorkommen dieser Viren in Putenbeständen.

Ziel dieses Projektes war es, die Prävalenz dieser Erreger in ausgewählten Putenbeständen zu ermitteln und eine verlässliche Diagnostik für Astro-, Rota- und Coronaviren zu etablieren.

Der Virusnachweis bzw. der Nachweis von viraler RNA erfolgte mittels konventioneller RT-PCR und Elektronenmikroskopie. Die Primer für die RT-PCRs zum Nachweis der viralen RNA von Astro- und Rotaviren wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit etabliert. Der Coronavirusnachweis erfolgte mittels einer PCR nach Cavanagh et al. (2001). Im Rahmen der differenzialdiagnostischen Untersuchungen wurde auch auf Salmonellen und parasitäre Durchfallerreger untersucht.

Für die Untersuchung wurden acht Betriebe aus dem süddeutschen Raum ausgewählt. Weibliche und männliche Tiere wurden getrennt beprobt. In einem Betrieb wurden nur Hennen gehalten. Die Sammelkotproben wurden von der 2. Woche an über die gesamte Mastzeit (Hähne 20 Wochen, Hennen 16 Wochen) im Abstand von zwei Wochen entnommen und am CVUA Stuttgart untersucht.

Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie wurden Mischinfektionen mit Astro- und Rotaviren in 18% der 107 untersuchten Kotproben nachgewiesen. Die Nachweisrate von Astroviren lag hier zwischen 28% bei männlichen und 36% bei weiblichen Tieren. 35% der Proben von Hähnen und 49% der Proben von Hennen waren Rotavirus-positiv.

Mittels RT-PCR konnte in allen Beständen Astro- und Rotavirus-RNA detektiert werden. Doppelinfektionen wurden in 84% (90/107) der untersuchten Proben mittels RT-PCR nachgewiesen. Die Prävalenz der Astrovirusinfektionen lag zwischen 98% und 100% bei Hähnen und Hennen. Rotavirus-RNA wurde in 83% der Proben von männlichen Tieren und in 87% der Proben von weiblichen Tieren festgestellt.

Coronaviren konnten weder mit dem Elektronenmikroskop noch mittels RT-PCR nachgewiesen werden.

Ein Vergleich der Ergebnisse beider virologischer Methoden zeigt eine deutlich höhere Sensitivität des viralen Genomnachweises mittels PCR gegenüber der Elektronenmikroskopie.

Die Untersuchungsergebnisse machen deutlich, dass man mit einer hohen Prävalenz von Astro- und Rotaviren in deutschen Putenbeständen rechnen muss. Im Gegensatz dazu konnten Coronaviren weder mittels Elektronenmikroskopie noch mittels RT-PCR nachgewiesen werden.

6 Summary

Detection of enteric viruses in turkey flocks using Transmission Electron Microscopy and RT-PCR

Enteric disorders are one of the most important groups of diseases affecting turkeys and continue to cause high economic losses in many areas world-wide. Several pathogens (viruses, bacteria and parasites) have ben incriminated as possible causes of enteric disorders either alone, in synergy with other microorganisms or with noninfectious causes such as feed or/and management related factors. Under field conditions, however, it is difficult to determine the true cause of enteric disorders.

Viruses from several virus families have been implicated as causative agents in enteric diseases in turkey such as turkey coronavirus, avian rota- and astroviruses. Currently there are no data available on the prevalence of these viruses in German meat turkey flocks.

The aim of the present investigation was therefore to establish reliable diagnostic tools and to monitor turkey flocks.

All samples were tested using transmission electron microscopy (TEM) as well as RT-PCR. For RT-PCRs, we designed specific primers for astro- and rotaviruses. The coronavirus identification was performed by a PCR which was developed by Cavanagh et al. (2001). For differential diagnosis of causes of enteric diseases we tested for Salmonella spp. and parasites.

Eight different commercial turkey farms located in Southern Germany were monitored. Faecal samples from hens and toms were collected separately at 2 week intervals from the 2nd to the 16th and 20th week of age (age of slaughter of females and males respectively) and screened for virus infections. One farm reared only hens.

Using TEM dual infections with rota- and astroviruses were detected in 18% of 107 samples tested. The incidence of astrovirus detection ranged between 28 and 36% in males and females respectively. For rotaviruses, the detection rate was 35% in males and 49% in females.

Using RT-PCR, infection with rota- and astroviruses was detected in all flocks. 84% (90/107) of the faecal samples tested were positive for both viruses at the same time. The incidence of astrovirus infection ranged between 98-100% in toms and hens re-

spectively. For rotaviruses the detection rate in males and females ranged between 83 and 87%.

No coronaviruses were detected in any of the flocks or samples using both TEM and RT-PCR.

A comparison of the results of both detection methods used exhibited higher sesitivity of the PCR assays compare electron microscopy.

The results of this study revealed a high prevalence of astro and rotavirus in turkey flocks in Germany. In contrast, no coronaviruses were detected by either RT-PCR or TEM.

7 Literaturverzeichnis

- Akimkin, V., Bindel, F., Hoferer, M., Sting, R., Polley, B., Hänel, A., und Hafez, H. M. (2011). One-step RT-qPCR with an internal control system for the detection of turkey rotaviruses in faecal samples. *Jornal of Virological Methods* **177**(1), 112-117.
- Appleton, H., und Higgins, P. G. (1975). Viruses and gastroenteritis in infants. *The Lancet* **305**(7919), 1297.
- Fa. Aviagen Turkeys Ltd. (2009). <u>http://en.aviagen.com/assets/Tech_Center/Turkeys_commercial/ATL/Mgt_Guid</u> e/ATL Big6 Commercial 0050.pdf (Datum des Zugriffs: 15. August 2011)
- Barnes, H. J., Guy, J. S., und Vaillancourt, J. P. (2000). Poult enteritis complex. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **19**(2), 565-588.
- Baumgart, J. (2004). Nachweis von pathogenen und toxinogenen Mikroorganismen. In: Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln. 5 ed., J. Baumgart, Ed. Behr`s Verlag, Hamburg. pp. 148-213.
- Boecking, O. (2006). Parasitosen des Nutzgeflügels (Huhn, Truthuhn, Gans, Ente, Taube). In: Veterinärmedizinische Parasitologie. 6. ed., T. Schindler, J. Boch, und R. Supperer, Eds. Parey Verlag, Stuttgart. pp. 576-648.
- Bozzola, J. J., und Russell, L. D. (1998). Specimen staining and contrast methods for transmission electron microscopy. In: Electron microscopy. Principles and Techniques for Biologists. 2nd ed., J. J. Bozzola, und L. D. Russell, Eds. Jones & Bartlett Publishers, Sudbery, Massachusetts. pp. 121-146.
- Breslin, J. J., Smith, L. G., Fuller, F. J., und Guy, J. S. (1999). Sequence Analysis of the Matrix/Nucleocapsid Gene Region of Turkey Coronavirus. *Intervirology* **42**, 22-29.
- Brodt, H. R. (2006). Rotaviren. In: Infektiologie des Gastrointestinaltraktes. W. F. Caspary, M. Kist, und J. Stein, Eds. Springer Berlin Heidelberg. pp. 387.
- Brüssow, H., Nakagomi, O., Gerna, G., und Eichhorn, W. (1992). Isolation of an Avianlike Group A Rotavirus from a Calf with Diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology* **30**(1), 67-73.
- Cattoli, G., De Battisti, C., Toffan, A., Salviato, A., Lavazza, A., Cerioli, M., und Capua, I. (2007). Co-circulation of distinct genetic lineages of astroviruses in turkeys and guinea fowl. *Archives of Virology* **152**(3), 595-602.
- Cavanagh, D. (2005). Coronaviruses in Poultry and other birds. Avian Pathology **34**(6), 439-448.
- Cavanagh, D., Mawdit, K., Sharma, M., Drury, S. E., Ainsworth, H. L., Britton, P., und Gough, R. E. (2001). Detection of a coronavirus from turkey poults in Europe genetically related to infectious bronchitis virus of chickens. *Avian Pathology* **30**(4), 355-368.
- Culver, F., Dziva, F., Cavanagh, D., und Stevens, M. (2006a). Poult enteritis and mortality syndrome in Great Britain. *Veterinary Record* **159**, 209-210.

- Culver, F., Dziva, F., Stevens, M., Britton, P., und Cavanagh, D. (2006b). Prevalence of coronavirus and astrovirus in turkeys in Great Britain. In: Proceedings of the V. International symposium on avian corona- and pneumoviruses and complicating pathogens. U. Heffels-Redmann, und E. F. Kaleta, Eds. VVB Laufersweiler Verlag, Rauischholzhausen, Germany. pp. 189-194.
- Davies, H. A., und Macnaughton, M. R. (1979). Comparison of the morphology of three coronaviruses. *Archives of Virology* **59**(1), 25-33.
- Day, J. M., Spackman, E., und Pantin-Jackwood, M. J. (2007). A Multiplex RT-PCR Test for the Differential Identification of Turkey Astrovirus Type 1, Turkey Astrovirus Type 2, Chicken Astrovirus, Avian Nephritis Virus, and Avian Rotavirus. Avian Diseases 51, 681-684.
- Dea, S., Verbeek, A. J., und Tijssen, P. (1990). Antigenic and Genomic Relationships among Turkey and Bovine Enteric Coronaviruses. *Journal of Virology* 64(6), 3112-3118.
- Doane, F. W., und Anderson, N. (1987). "Electron microscopy in diagnostic virology. A practical guide and atlas." Cambridge University Press, New York.
- Drosten, C., Günter, S., Preiser, W., und Werf., S. v. d. (2003). Identification of a Novel Coronavirus in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. *The new England Jornal of Medicine* **348**(20), 1967-976.
- Eckert, J., Friedhoff, K. T., Zahner, H., und Deplazes, P. (2008). Parasitosen des Geflügels. In: Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin. 2. ed., J. Eckert, K. T. Friedhoff, H. Zahner, und P. Deplazes, Eds. Enke Verlag, Stuttgart. pp. 590-594.
- Fabricant, J. (1998). The Early History of Infectious Bronchitis. *Avian Diseases* **42**, 648-650.
- Fong, C. K. (1994). Electron Microscopy and Immunoelectron Microscopy. In: Hsiung's diagnostic virology. G. D. Hsiung, C. K. Fong, und M. L. Landry, Eds. Yale University Press, New Haven and London. pp. 99-107.
- Forster, J., und Hammerschmidt, T. (2007). Krankheitslast durch akute Rotavirus-Gastroenteritis (RV-AGE) in Deutschland: Ein Vergleich offizieller Statistiken mit epidemiologischen Daten. *Das Gesundheitswesen* **69**(04), 227-232.
- Gelderblom, H. R., Renz, H., und Özel, M. (1991). Negative staining in diagnostic virology. *Micron and Microscopica Acta* **22**(4), 135-147.
- Gomaa, M. H., Yoo, D., Ojkic, D., und Barta, R. (2009). Virus shedding and serum antibody responses during experimental turkey coronavirus infections in young turkey poults. *Avian Pathology* 38(2), 181-186.
- Gomara, M. I., Green, J., Brown, J., Desselberger, U., und Gray, J. (2000). Diversiti within the VP4 Gene of Rotavirus P[8] Strains: Implications for Reverse Transcription-PCR Genotyping. *Journal of Clinical Microbiology* **38**(2), 898-901.
- Gomara, M. I., Wong, C., Blome, S., Desselberger, U., und Gray, J. (2002). Molecular Characterization of VP6 Genes of Human Rotavirus Isolates: Correlation of Genogrups with Subgroups and Evidence of Independent Segregation. *Journal* of Virology **76**(13), 6596-6601.
- Gouvea, V., Glass, R. I., Woods, P., Taniguchi, K., Clark, H. F., Forrester, B., und Fang, Z. (1990). Polymerase Chain Reaction Amplification and Typing of Rotavirus Nucleic Acid from Stool Specimens. *Journal of Clinical Microbiology* **28**(3), 276-282.
- Guy, J. S. (1998). Virus Infektions of the Gastrointestinal Tract of Poultry. *Poultry Science* **77**(8), 1166-1175.

- Guy, J. S. (2000). Turkey coronavirus is more closely related to avian infectious bronchitis virus than to mammalian coronaviruses: a review. *Avian Pathology* **29**(3), 207-212.
- Guy, J. S. (2008). Turkey Coronavirus Enteritis. In: Diseases of Poultry. 12th ed., Y. M. Saif, A. M. Fadly, J. R. Glisson, L. R. McDouglad, L. K. Nolan, und D. E. Swayne, Eds. Iowa State University Press., Iowa, USA. pp. 330-338.
- Hafez, H. M. (2001). Enteric diseases of turkeys. In: Turkey Production in Europe in the New Millennium. H. M. Hafez, Ed. Verlag Eugen Ulmer. pp. 164-181.
- Hafez, H. M. (2008). Poultry coccidiosis: prevention and control approaches. *Archiv für Geflügelkunde* **72**, 2-7.
- Hafez, H. M., und Jodas, S. (1997). "Putenkrankheiten." Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
- Hayat, M. A. (2000). Negative staining. In: Electron microscopy. Biological applications. 4th ed., M. A. Hayat, Ed. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 367-399.
- Hess, M., und Monreal, G. (2005). Astroviridae. In: Kompendium der Geflügelkrankheiten. 6., O. Siegmann, und U. Neumann, Eds. Schlüterische Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG, Hannover. pp. 120-122.
- International Organization for Standardization (2007). "ISO 6579 AMD 1: Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln - Horizontales Verfahren zum Nachweis von Salmonellen spp.; Änderung 1: Anhang D: Nachweis von Samonella spp. in Tierfäkalien und in Proben aus der Primärproduktion." Beuth Verlag, Berlin.
- Jindal, N., Patnayak, D. P., Chander, A. F., Ziegler, A. F., und Goyal, M. (2010). Detektion and molecular characterisation of enteric viruses from poult enteritis syndrome in turkeys. *Poultry Science* 89, 217-226.
- Jindal, N., Patnayak, D. P., Ziegler, A. F., Lago, A., und Goyal, M. (2009). A Retrospective Study on Poult Enteritis Syndrome in Minnesota. *Avian Diseases* 53, 268-275.
- Jonassen, C., M., Kofstad, T., Larsen, I.-L., Lovland, A., Handeland, K., Follestad, A., und Lillehaug, A. (2005). Molecular identification and characterization of novel coronaviruses infecting graylag geese (Anser anser), feral pigeons (Columbia livia) and mallards (Anas platyrhynchos). *Journal of General Virology* 86, 1597-1607.
- Kirkwood, C. (2010). Rotavirus. In: PCR for Clinical Microbiology: An Australian and International Perspective. M. Schuller, T. P. Sloots, G. S. James, C. L. Halliday, und C. I. W. J., Eds. Springer Netherlands. pp. 325-329.
- Koci, M. D., Moser, L. A., Kelley, L. A., Larsen, D., Brown, C. C., und Schultz-Cerry, S. (2003). Astrovirus Induces Diarrhea in the Absence of Inflamation and Cell Death. *Journal of Virology* **77**(21), 11798-11808.
- Koci, M. D., und Schultz-Cherry, S. (2002). Avian astroviruses. Avian Pathology **31**, 213-227.
- Koci, M. D., Seal, B. S., und Schultz-Cerry, S. (2000a). Development of an RT-PCR diagnostic test for an avian astrovirus. *Jornal of Virological Methods* **90**, 79-83.
- Koci, M. D., Seal, B. S., und Schultz-Cerry, S. (2000b). Molecular Characterization of Avian Astrovirus. *Jornal of Virology* **74**(13), 6173-6177.
- Laue, M., und Bannert, N. (2010). Detection limit of negative staining electron microscopy for the diagnosis of bioterrorism-related micro-organisms. *Jornal of Applied Microbiology* **109**(4), 1159-1168.

- Less, B., und Kaaden, O. (2003). Familie Astroviridae. In: Virusinfektionen bei Hausund Nutztieren. 2. ed., B. Less, und O. Kaaden, Eds. Schlütersche GmbH& Co. KG, Hannover. pp. 155.
- Lin, T. L., Loa, C. C., Wu, C. C., Bryan, T. A., Hooper, T., und Schrader, D. (2002). Antigenic Relationship of Turkey Coronavirus Isolates from Different Geographic Locations in the United States. *Avian Diseases* **46**, 466-472.
- Lojkic, I., Bidin, M., Boidin, Z., und Mikec, M. (2010). Viral Agents Associated with Poult Enteritis in Croatian Commercial Turkey Flocks. *Acta Veterinaria Brno* **79**, 91-98.
- Madeley, C. R., und Cosgrove, B. P. (1975). 28nm Particles in faeces in infantile gastroenteritis. *The Lancet* **306**(7632), 451-452.
- Madeley, C. R., und Field, A. M. (1988). "Virus Morphology." 2d ed. ed. Churchill Livingstone, New York.
- Maurel, S., Toquin, D., Queguiner, M., Men, M., Allee, C., Lamande, J., Bertin, J., Ravillion, L., Retaux, C., Turblin, V., Morvan, H., Picault, J. P., und Eterradossi, N. (2009). Molecular identification and characterization of a turkey coronavirus in France. In: Proceedings of the VI International Symposium on Avian Coronaand Pneumoviruses and Complicating Pathogens. U. Heffels-Redmann, D. Sommer, und E. F. Kaleta, Eds., Rauischholzhausen, Germany. pp. 209-218.
- Mayr, A., und Kaaden, O. (2007). Viruskrankheiten der Tiere. In: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 8 ed., M. Rolle, und A. Mayr, Eds. Enke, Stuttgart. pp. 136-343.
- McNulty, M. S., und Reynolds, D. L. (2008). Rotavirus Infektions. In: Diseases of Poultry. 12th ed., Y. M. Saif, A. M. Fadly, J. R. Glisson, L. R. McDouglad, L. K. Nolan, und D. E. Swayne, Eds. Iowa State University Press., Iowa, USA. pp. 338-350.
- Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M., und Tauxe, R. V. (1999). Food-Related Illness and Death in the United States. *Emerging Infectious Diseases* 5, 607-625.
- Mendez, E., und Arias, C. F. (2007). Astroviruses. In: Fields virology. 5th ed., D. M. Knipe, und P. M. Howley, Eds. Lippincott Williams & Wilkins, Pholadelphia. pp. 981-998.
- Modrow, S., Falke, D., und Truyen, U. (2003). Evolution von Viren. In: Molekulare Virologie. S. Modrow, D. Falke, und U. Truyen, Eds. Spektrum Akademische Verlag GmbH, Heidelberg Berlin. pp. 109-113.
- Modrow, S., Falke, D., Truyen, U., und Schätzl, H. (2010a). Astroviren. In: Molekulare Virologie. S. Modrow, D. Falke, U. Truyen, und H. Schätzl, Eds. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. pp. 178-180.
- Modrow, S., Falke, D., Truyen, U., und Schätzl, H. (2010b). Coronaviren. In: Molekulare Virologie. S. Modrow, D. Falke, U. Truyen, und H. Schätzl, Eds. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. pp. 246-262.
- Modrow, S., Falke, D., Truyen, U., und Schätzl, H. (2010c). Reoviren. In: Molekulare Virologie. S. Modrow, D. Falke, U. Truyen, und H. Schätzl, Eds. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. pp. 390-406.

- Moreno, M. A., Vinco, L. J., Cordioli, P., und Lavazza, A. (2002). Diagnosis of turkey viral enteric diseases by electron microscopy and identification of coronavirus in a case of turkey enteritis. In: Proceedings of the 4th Internatinal Symposium on Turkey Diseases. H. M. Hafez, Ed. DVG-Verlag, Berlin. pp. 83-88.
- Mori, Y., Borgan, M. A., Ito, N., Sugiyama, M., und Minamoto, N. (2002). Sequential analysis of nonstructural protein NSP4s derived from Group A avian rotaviruses. *Virus Research* 89, 145-151.
- Murphy, F. A., Gibbs, E. P. J., Horzinek, M. C., und Studdert, M. J. (1999a).
 Astroviridae. In: Veterinary Virology. 3. ed., F. A. Murphy, E. P. J. Gibbs, M. C. Horzinek, und M. J. Studdert, Eds. Academic Press, San Diego. pp. 543-546.
- Murphy, F. A., Gibbs, E. P. J., Horzinek, M. C., und Studdert, M. J. (1999b). Coronaviridae. In: Veterinary Virologiy. F. A. Murphy, E. P. J. Gibbs, M. C. Horzinek, und M. J. Studdert, Eds. Academic Press, San Diego. pp. 495-508.
- Paeffgen, D., Hafez, H. M., Raether, W., und Bohn, M. (1988). Oozysten-Ausscheidung und Gesundheitszustand in der Putenmast bei unterschiedlichen Kokzidiose-Prophylaxeprogrammen. DVG Tagung der Fachgruppe "Geflügelkrankheiten" in Verbindung mit WVPA und der Abt. Geflügelkrankheiten der I. Med. Klinik, Veterinärmedizinische Universität Wien, 213-226.
- Palmer, E. L., und Martin, M. L. (1988). "Electron microscopy in viral diagnosis." CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- Pantin-Jackwood, M. J., Spackman, E., und Day, J. M. (2008). Pathogenesis of typ 2 turkey astroviruses with variant capsid in 2-day-old specific pathogen free poults. Avian Pathology 37(2), 193-201.
- Pantin-Jackwood, M. J., Spackman, E., Day, J. M., und Rives, D. (2007). Periodic Monitoring of Commercial Turkeys for Enteric Viruses Indicates Continuous Presence of Astrovirus and Rotavirus on the Farms. *Avian Diseases* **51**(3), 674-680.
- Pantin-Jackwood, M. J., Spackman, E., und Woolcock, P. R. (2006a). Molecular Characterization and Typing of Chicken and Turkey Astroviruses Circulating in the United States: Implications for Diagnostics. *Avian Diseases* **50**, 397-404.
- Pantin-Jackwood, M. J., Spackman, E., und Woolcock, P. R. (2006b). Phylogenetic analysis of turkey astroviruses reveals evidence of recombination. *Virus Genes* 32, 187-192.
- Parashar, U. D., Bresee, J. S., Gentsch, J. R., und Glass, R. I. (1998). Rotavirus. *Emerging Infectious Diseases* **4**(4), 561-570.
- Peterson, E. H., und Hymas, T. A. (1951). Antibiotics in the Treatment of an Unfamiliar Turkey Disease. *Poultry Science* **30**, 466-468.
- Quiroga, M. A., Cappuccio, J., Pineyro, P., Basso, W., More, G., Kienast, M., Schonfeld, S., Cancer, J. L., Arauz, S., Pintos, M. E., Nanni, M., Machuca, M., Hirano, N., und Perfumo, C. J. (2008). Hemagglutinating encephalomyelitis coronavirus infection in pigs, Argentina. *Emerging Infectious Diseases* **14**(3), 484-486.
- Reynolds, D. L., und Schulz-Cherry, S. L. (2008). Astrovirus Infections. In: Diseases of Poultry. 12th ed., Y. M. Saif, A. M. Fadly, J. R. Glisson, L. R. McDouglad, L. K. Nolan, und D. E. Swayne, Eds. Iowa State University Press., Iowa, USA. pp. 351-356.
- Rodriguez-Diaz, J., Rubilar-Abreu, E., Spitzner, M., Hedlund, K., Liprandi, F., und Svensson, L. (2008). Design of a multiplex nested PCR for genotyping of the NSP4 from group A rotavirus. *Journal of Virological Methods* **149**, 240-245.

- Saif, Y. M. (2008). Viral Enteric Infections. In: Diseases of poultry. 12th ed., Y. M. Saif, A. M. Fadly, J. R. Glisson, L. R. McDouglad, L. K. Nolan, und D. E. Swayne, Eds. Iowa State University Press., Iowa, USA. pp. 329-330.
- Selbitz, H.-J. (2007). Bakterielle Krankheiten der Tiere. In: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 8 ed., M. Rolle, und A. Mayr, Eds. Enke, Stuttgart. pp. 393-558.
- Sellers, H. S., Koci, M. D., Linnemann, E., Kelley, L. A., und Schultz-Cerry, S. (2004). Development of a Multiplex Reverse Transkription-Polymerase Chain Reaction Diagnostic Test Specific for Turkey Astrovirus and Coronavirus. *Avian Diseases* 48, 531-539.
- Spackman, E., Kapczynski, D., und Sellers, H. (2005). Multiplex Real-Time Reverse Transkription-Polymerase Chain Reaction for the Detection of Three Vireses Associated with Poul Enteritis Complex: Turkey Astrovirus, Turkey Coronavirus, and Turkey Reovirus. *Avian Diseases* **46**, 86-91.
- Stephensen, C. B., Casebolt, D. B., und Gangopadhyay, N. N. (1999). Phylogenetic analysis of a highly conserved region of the polymerase gene from 11 coronaviruses and development of a consensus polymerase chain reaction assay. *Virus Research* **60**, 181-189.
- Tang, Y., Ismail, M. M., und Saif, Y. M. (2005). Development of Antigen-Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and RT-PCR for Detection of Turkey Astroviruses. Avian Diseases 49, 182-188.
- Teixeira, M. C. B., Luvizotto, M. C. R., Ferrari, H. F., Mendes, A. R., Da Silvia, S. E. L., und Cardoso, T. C. (2007). Detection of turkey coronavirus in commercial turkey poults in Brazil. Avian Pathology 36(1), 29-33.
- Villarreal, L. Y. B., Assayag, M. S., Brandão, P. E., Chacón, J. L. V., Bunger, A. N. D., Astolfi-Ferreira, C. S., Gomes, C. R., Jones, R. C., und Ferreira, A. J. P. (2006). Identification of Turkey Astrovirus and Turkey Coronavirus in an Outbreak of Poult Enteritis and Mortality Syndrome. *Brazilian Journal of Poultry Science* 8(2), 131-135.
- Woolcock, P. R., und Shivaprasad, H. L. (2008). Electron Microscopic Identification of Viruses Associated with Poult Enteritis in Turkeys Grown in California 1993– 2003. Avian Diseases 52(2), 209-213.
- Yason, C. V., und Schat, K. A. (1986). Pathogenesis of rotavirus infection in turkey poults. *Avian Pathology* **15**(3), 421-435.
- Yason, C. V., Summers, B. A., und Schat, K. A. (1987). Pathogenesis of rotavirus infection in various age groups of chickens and tukeys: pathology. *American journal of veterinary research* 48(6), 927-38.

Internetadressen:

www.ncbi.nlm.nih.gov www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py

8 Anhang

8.1 Sequenzervergleich der NSP4-Gensequenzen des Rotavirus

Markierten Sequenzabschnitte entsprechen den Primer-Bindungsstellen.

Rotavirus_NSP4_Farm_1 CCGTGGGGAAAGATGGAGAACGCTACCAGCATCAACGAGACATTTGTGGA 50 CCGTGGGGAAAGATGGAGAACGCTACCAGCATCAACGAGACATTTGTGGA 50 Rotavirus_NSP4_Farm_4 Rotavirus_NSP4_Farm_6 CCGTGGGGAAAGATGGAGAACGCTACCAGCATCAACGAGACATTTGTGGA 50 Rotavirus_NSP4_Farm_7 CCGTGGGGAAAGATGGAGAACGCTACCAGCATCAACGAGACATTTGTGGA 50 CCGTGGGGAAAGATGGAGAACGCTACCAGCATCAACGAGACATTTGTGGA 50 Rotavirus_NSP4_Farm_3 Rotavirus_NSP4_Farm_8 CCGTGGGGAAAGATGGAGAACGCTACCAGCATCAACGAGACATTTGTGGA 50 Rotavirus_NSP4_Farm_5 CCGTGGGGAAAGATGGAGAACGCTACCAGCATCAACGAGACATTTGTGGA 50 Rotavirus_NSP4_Farm_2 CCGTGGGGAAAGATGGAGAACGCTACCAGCATCAACGAGACATTTGTGGA 50 AY062937.1 CCGTGCGGAAAGATGGAGAACGCTACCAGCATCAACGAGACATTTGTGGA 50

Rotavirus_NSP4_Farm_1 Rotavirus_NSP4_Farm_4 Rotavirus_NSP4_Farm_6 Rotavirus_NSP4_Farm_7 Rotavirus_NSP4_Farm_3 Rotavirus_NSP4_Farm_8 Rotavirus_NSP4_Farm_5 Rotavirus_NSP4_Farm_2 AY062937.1 GGAGGTGTATAATATGACATTAAGTTATTTTGAGCATAACGTAATAATTA100GGAGGTGTATAATATGACATTAAGTTATTTTGAGCATAACGTAATAATTA100GGAGGTGTATAATATGACATTAAGTTATTTTGAGCATAACGTAATAATTA100GGAGGTGTATAATATGACATTAAGTTATTTTGAGCATAACGTAATAATTA100GGAGGTGTATAATATGACATTAAGTTATTTTGAGCATAACGTAATAATTA100GGAGGTGTATAATATGACATTAAGTTATTTTGAGCATAACGTAATAATTA100GGAGGTGTATAATATGACATTAAGTTATTTTGAGCATAACGTAATAATTA100GGAGGTGTATAATATGACATTAAGTTATTTTGAGCATAACGTAATAATTA100GGAGGTGTATAATATGACATTAAGTTATTTTGAGCATAACGTAATAATTA100GGAGGTGTATAATATGACATTAAGTTATTTTGAGCATAACGTAATAATTA100GGAGGTGTATAATATGACACTAAGTTATTTTGAGCATAACGTAATAATTA100

Rotavirus_NSP4_Farm_1 Rotavirus_NSP4_Farm_4 Rotavirus_NSP4_Farm_6 Rotavirus_NSP4_Farm_7 Rotavirus_NSP4_Farm_3 Rotavirus_NSP4_Farm_8 Rotavirus_NSP4_Farm_5

TGAAATACTTTCCATTTCTAGCGTCCATTCTCACAATAGTGTTTACTGCT 150	
TGAAATACTTTCCATTTCTAGCGTCCATTCTCACAATAGTGTTTACTGCT 150	
TGAAATACTTTCCATTTCTAGCGTCCATTCTCACAATAGTGTTTACTGCT 150	
TGAAATACTTTCCATTTCTAGCGTCCATTCTCACAATAGTGTTTACTGCT 150	
TGAAATACTTTCCATTTCTAGCATCCATTCTCACAATAATGTTTACTGCT 150	
TGAAATACTTTCCATTTCTAGCATCCATTCTCACAATAATGTTTACTGCT 150	
TGAAATACTTTCCATTCCTAGCGTCCATTCTCACAATAGTGTTTACTGTT 150	

Rotavirus_NSP4_Farm_1 Rotavirus_NSP4_Farm_4 Rotavirus_NSP4_Farm_6 Rotavirus_NSP4_Farm_7 Rotavirus_NSP4_Farm_3 Rotavirus_NSP4_Farm_8 Rotavirus_NSP4_Farm_5 Rotavirus_NSP4_Farm_2 AY062937.1 AGGATATAAAGTAGTGAGAGTGGTAGTTATAACAATGTTTAACTGTGTAA250AGGATATAAAGTAGTGAGAGTGGTAGTTATAACAATGTTTAACTGTGTAA250AGGATATAAAGTAGTGAGAGTGGTAGTTATAACAATGTTTAACTGTGTAA250AGGATATAAAGTAGTGAGAGTGGTAGTTATAACAATGTTTAACTGTGTAA250AGGATATAAAGTAGTGAGAGTGGTAGTTATAACAATGTTTAACTGTGTAA250AGGATATAAAGTAGTGAGAGTGGTAGTTATAACAATGTTTAACTGTGTAA250AGGATATAAAGTAGTGAGAGTGGTAGTTATAACAATGTTTAACTGTGTAA250AGGATATAAAGTAGTGAGAGTGGTAGTTATAACAACGTTTAACTGTGTAA250AGGATATAAAGTAGTGAGAGTGGTAGTTATAACAACGTTTAACTGTGTAA250AGGATATAAAGTAGTGAGAGTGGTAGTTATAACAACGTTTAACTGTGTAA250

Rotavirus_NSP4_Farm_1 Rotavirus_NSP4_Farm_4 Rotavirus_NSP4_Farm_6 Rotavirus_NSP4_Farm_7 Rotavirus_NSP4_Farm_3 Rotavirus_NSP4_Farm_8 Rotavirus_NSP4_Farm_5 Rotavirus_NSP4_Farm_2 AY062937.1 TGCGTTTATTTGGTTCACAAGCTGAAGTGGTCTCAGATGACAGATTGGAC300TGCGTTTATTTGGTTCACAAGCTGAAGTGGTCTCAGATGACAGATTGGAC300TGCGTTTATTTGGCTCACAAGCTGAAGTGGTCTCAGATGACAGATTGGAC300TGCGTTTATTTGGCTCACAAGCTGAAGTGGTCTCAGATGACAGATTGGAC300TGCGTTTATTTGGCTCACAAGCTGAAGTGGTCTCAGATGACAGATTGGAC300TGCGTTTATTTGGCTCACAAGCTGAAGTGGTCTCAGATGACAGATTGGAC300TGCGTTTATTTGGCTCACAAACTGAAGTGGTCTCAGATGACAGATTGGAC300TGCGTTTATTTGGCTCACAAACTGAAGTGGTCTCAGATGACAGATTGGAC300TGCGTTTATTTGGCTCACAAACTGAAGTGGTCTCAGATGACAGATTGGAC300TGCGTTTATTTGGCTCACAAACTGAAGTGGTCTCAGATGACAGATTGGAC300TGCGTTTATTTGGCTCAAAAACTGAAGTGGTCTCAGATGACAGATTGGAC300

Rotavirus_NSP4_Farm_1 Rotavirus_NSP4_Farm_4 Rotavirus_NSP4_Farm_6 Rotavirus_NSP4_Farm_7 Rotavirus_NSP4_Farm_3 Rotavirus_NSP4_Farm_8 Rotavirus_NSP4_Farm_5 Rotavirus_NSP4_Farm_2 AY062937.1 GCATTAGCTTCTAAAATAGTGGCGCAGATTGCAGAACAGGTTAAAGTAAT350GCATTAGCTTCTAAAATAGTGGCGCAGATTGCAGAACAGGTTAAAGTAAT350GCATTAGCTTCTAAAATAGTGGCGCAGATTGCAGAACAGGTTAAAGTAAT350GCATTAGCTTCTAAAATAGTGGCGCAGATTGCAGAACAGGTTAAAGTAAT350GCATTAGCTTCTAAAATAGTGGCGCAGATTGCAGAACAGGTTAAAGTAAT350GCATTAGCTTCTAAAATAGTGGCGCAGATTGCAGAACAGGTTAAAGTAAT350GCATTAGCTTCTAAAATAGTGGCGCAGATTGCAGAACAGGTTAAAGTAAT350GCATTAGCTTCTAAAATAGTGACGCAGATTGCAGAACAAGTTAAAGTAAT350GCATTAGCTTCTAAAATAGTGGCGCAGATTGCAGAACAAGTTAAAGTAAT350GCATTAGCTTCTAAAATAGTGGCGCAGATTGCCAGAACAAGTTAAAGTAAT350GCATTAGCTTCTAAAATAGTGGCGCAAATTGCCGACCAAGTTAAAGTAAT350

Anhang

Rotavirus_NSP4_Farm_1 Rotavirus_NSP4_Farm_4 Rotavirus_NSP4_Farm_6 Rotavirus_NSP4_Farm_7 Rotavirus_NSP4_Farm_3 Rotavirus_NSP4_Farm_8 Rotavirus_NSP4_Farm_5 Rotavirus_NSP4_Farm_2 AY062937.1

Rotavirus_NSP4_Farm_1 Rotavirus_NSP4_Farm_4 Rotavirus_NSP4_Farm_6 Rotavirus_NSP4_Farm_7 Rotavirus_NSP4_Farm_3 Rotavirus_NSP4_Farm_8 Rotavirus_NSP4_Farm_5 Rotavirus_NSP4_Farm_2 AY062937.1 TTTATGAAATGCTGAAAATGAAAAGAATGATGTAGATATGTCATTTGAG450TTTATGAAATGCTGAAAATGAAAAGAATGATGTAGATATGTCATTTGAG450TTTATGAAATGCTGAAAATGAAAAGAATGATGTAGATATGTCATTTGAG450TTTATGAAATGCTGAAAATGAAAAGAATGATGTAGATATGTCATTTGAG450TTTATGAAATGCTGAAAATGAAAAGAATGAATGATGTAGATATGTCATTTGAG450TTTATGAAATGCTGAAAATGAAAAGAAATGAATGATGTAGATATGTCATTTGAG450TTTATGAAATGCTGAAAATGAAAAGAAAGAATGATGTAGATATGTCATTTGAG450TTTATGAAATGCTGAAAATGAAAAGAATGAATGATGTAGATATGTCATTTGAG450TTTATGAAATGCTGAAAATGAAAAGAATGAATGATGTAGATATGTCATTTGAG450

Rotavirus_NSP4_Farm_1 Rotavirus_NSP4_Farm_4 Rotavirus_NSP4_Farm_6 Rotavirus_NSP4_Farm_7 Rotavirus_NSP4_Farm_3 Rotavirus_NSP4_Farm_8 Rotavirus_NSP4_Farm_5 Rotavirus_NSP4_Farm_2 AY062937.1 ACTAACAAAAAAGAATATGAAAAATGGATGAAAGATCCATATCAACCTAC500ACTAACAAAAAAGAATATGAAAAATGGATGAAAGATCCATATCAACCTAC500ACTAACAAAAAAGAATATGAAAAATGGATGAAAGATCCATATCAACCTAC500ACTAACAAAAAAGAATATGAAAAATGGATGAAAGATCCATATCAACCTAC500ACTAACAAAAAAGAATATGGAAAAATGGATGAAAGATCCATATCAACCTAC500ACTAACAAAAAAGAATATGGAAAAATGGATGAAAGATCCATATCAACCTAC500ACTAACAAAAAAGAATATGAGAAAATGGATGAAAGATCCATATCAACCTAC500ACTAACAAAAAAGAATATGAGAAATGGATGAAAGATCCATATCAACCTAC500ACTAACAAAAAAGAATATGAGAAATGGGTGAAAGATCCATATCAACCTAC500ACTAACAAAAAAGAATATGAGAAATGGATGAAAGATCCATATCAAACCTAC500

Rotavirus_NSP4_Farm_1 Rotavirus_NSP4_Farm_4 Rotavirus_NSP4_Farm_6 Rotavirus_NSP4_Farm_7 Rotavirus_NSP4_Farm_3 Rotavirus_NSP4_Farm_8 Rotavirus_NSP4_Farm_5 Rotavirus_NSP4_Farm_2 AY062937.1 TCGTGCAGTGTCGCTAGATTGATGCCTCGTGTCCATGTTGTCGAAAGAAG550TCGTGCAGTGTCGCTAGATTGATGCCTCGTGTCCATGTTGTCGAAAGAAG550TCGTGCAGTGTCGCTAGATTGATGCCTCGTGTCCATGTTGTCGAAAGAAG550TCGTGCAGTGTCGCTAGATTGATGCCTCGTGTCCATGTTGTCGAAAGAAG550TCGTGCAGTGTCGCTAGATTGATGCCTCGTGTCCATGTTGTCGAAAGAAG550TCGTGCAGTGTCGCTAGATTGATGCCTCGTGTCCATGTTGTCGAAAGAAG550TCGTGCAGTGTCGCTAGATTGATGCCTCGTGTCCATGTTGTCGAAAGAAG550TCGTGCAGTGTCACTAGATTGATGCCTCGTGTCCATGTTGTCGAAAGAAG550TCGTGCAGTGTCACTAGATTGATGCCTCGTGTCCATGTTGTCGAAAGAAG550TCGTGCAGTGTCACTAGATTGATGCCTCGTGTCCATGTTGTCGAAAGAAG550

Rotavirus_NSP4_Farm_1 Rotavirus_NSP4_Farm_4 Rotavirus_NSP4_Farm_6 Rotavirus_NSP4_Farm_7 Rotavirus_NSP4_Farm_3 Rotavirus_NSP4_Farm_8 Rotavirus_NSP4_Farm_5 Rotavirus_NSP4_Farm_2 AY062937.1 CATGGAGCGACGGGTAGGACCATCGGACCTGCATGAGTGTAGAGAAGCCA600CATGGAGCGACGGGTAGGACCATCGGACCTGCATGAGTGTAGAGAAGCCA600CATGGAGCGACGGGTAGGACCATCGGACCTGCATGAGTGTAGAGAAGCCA600CATGGAGCGACGGGTAGGACCATCGGACCTGCATGAGTGTAGAGAAGCCA600CATGGAGCGACGGGTAGGACCATCGGACCTGCATGAGTGTAGAGAAGCCA600CATGGAGCGACGGGTAGGACCATCGGACCTGCATGAGTGTAGAGAAGCCA600CATGGAGCGACGGGTAGGACCATCGGACCTGCATGAGTGTAGAGAAGCCA600CATGGAGCGACGGGTAGGACCATCGGACCTGCATGAGTGTAGAGAAGCCA600CATGGAGCGACGGGTAGGACCATCGGACCTGCATGAGTGTAGAGAAGCCA600CATGGAGCGACGGGTAGGACCATCGGACCTGCATGAGTGTAGAGAAGCCA600CATGGAGCGACGGGTAGGACCATCGGACCTGCATGAGTGTAGAGAAGCCA600

Rotavirus_NSP4_Farm_1	CTACACTCATGATCGGGTGTGTCAA <mark>GAAGCCTTAATCCCTGGTACCCCAA</mark>	650
Rotavirus_NSP4_Farm_4	CTACACTCATGATCGGGTGTGTCAAGAAGCCTTAATCCCTGGTACCCCAA	650
Rotavirus_NSP4_Farm_6	CTACACTCATGATCGGGTGTGTCAAGAAGCCTTAATCCCTGGTACCCCAA	650
Rotavirus_NSP4_Farm_7	CTACACTCATGATCGGGTGTGTCAA <mark>GAAGCCTTAATCCCTGGTACCCCAA</mark>	650
Rotavirus_NSP4_Farm_3	CTACACTCATGATCGGGTGTGTCAA <mark>GAAGCCTTAATCCCTGGTACCCCAA</mark>	650
Rotavirus_NSP4_Farm_8	CTACACTCATGATCGGGTGTGTCAA <mark>GAAGCCTTAATCCCTGGTACCCCAA</mark>	650
Rotavirus_NSP4_Farm_5	CTACACTCATGATCGGGTGTGTCAA <mark>GAAGCCTTAATCCCTGGTACCCCAA</mark>	650
Rotavirus_NSP4_Farm_2	CTACACTCATGATCGGGTGTGTCAA <mark>GAAGCCTTAATCCCTGGTACCCCAA</mark>	650
AY062937.1	CTACACTCATGATCGGGTGTGTCAAGAAGACTTAATCCCTGGTACCCCAA	650

Rotavirus_NSP4_Farm_1	C 651
Rotavirus_NSP4_Farm_4	C 651
Rotavirus_NSP4_Farm_6	C 651
Rotavirus_NSP4_Farm_7	C 651
Rotavirus_NSP4_Farm_3	C 651
Rotavirus_NSP4_Farm_8	C 651
Rotavirus_NSP4_Farm_5	C 651
Rotavirus_NSP4_Farm_2	C 651
AY062937.1	C 651
	*

8.2 Sequenzervergleich der ORF1b-Gensequenzen des Astrovirus

Markierten Sequenzabschnitte entsprechen den Primer-Bindungsstellen.

TAstroV-2_ORF1b_Farm_2	TGGTGATGGAGATAGGTATTTTGTTGAGGACTGGACGGGGGTATGATG	50
TAstroV-2_ORF1b_Farm_6	TGGTGATGGAGATAGGTATTTTGTTGAGGACTGGACGCGGTATGATG	50
TAstroV-2_ORF1b_Farm_7	TGGTGATGGAGATAGGTATTTTGTTGAGGACTGGACGCGGGTATGATG	50
TAstroV-2_ORF1b_Farm_1	TGGTGATGGAGATAGGTATTTTGTTGAGGACTGGACGCGCGTATGATG	50
TAstroV-2_ORF1b_Farm_3	TGGTGATGGAGATAGGTATTTTGTTGAGGACTGGACGCGCGTATGATG	50
TAstroV-2_ORF1b_Farm_8	TGGTGATGGAGATAGGTATTTTGTTGAGGACTGGACGCGGGTATGATG	50
TAstroV-2_ORF1b_Farm_5	TGGTGATGGAGATAGGTATTTTGTTGAGGACTGGACGCGGGTATGATG	50
TAstroV-2_ORF1b_Farm_4	TGGTGATGGAGATAGGTATTTTGTTGAGGACTGGACGCGGTATGATG	50
TAstroV-2_ORF1b_GQ301034.1	TGGTGATGGAGATAGGTATTTTGTTGAGAGACGGACACGGTATGATG	50

TAstroV-2_ORF1b_Farm_2	GGACCATACCGAAGCCACTATTTTGGAGGATTAGACAGATCAGGTTTTTC 10	00
TAstroV-2_ORF1b_Farm_6	GGACCATACCGAAGCCACTATTTTGGAGGATTAGACAGATCAGGTTTTTC 1	00
TAstroV-2_ORF1b_Farm_7	GGACCATACCGAAGCCACTATTTTGGAGGATTAGACAGATCAGGTTTTTC 1	00
TAstroV-2_ORF1b_Farm_1	GGACTATACCAAAGCCATTATTTTGGAGGATTAGACAGATCAGGTTTTTC 10	00
TAstroV-2_ORF1b_Farm_3	GGACTATACCAAAGCCATTATTTTGGAGGATCAGACAGATCAGGTTTTTC 1	00
TAstroV-2_ORF1b_Farm_8	GGACTATACCAAAGCCATTATTTTGGAGGATCAGACAGATTAGGTTTTTC 1	00
TAstroV-2_ORF1b_Farm_5	GGACTATACCAAAGCCATTATTTTGGAGGATTAGACAGATCAGGTTTTTC 1	00
TAstroV-2_ORF1b_Farm_4	GGACTATACCAAAATCATTATTTTGGAGAATTAGGCAAATTAGGTTTTTC 10	00
TAstroV-2_ORF1b_GQ301034.1	GGACTATACCAAAATCACTATTTTGGAGAATTAGGCAAATTAGGTTCTTC 1	00
	**** ***** ** ** ** ******* ** ** ** **	
TAstroV-2_ORF1b_Farm_2	TTCCTTCATGATTCCCATAAGACCCAAAAAATGCGGCGCTTGTACAATTG 1	50
TAstroV-2_ORF1b_Farm_6	TTCCTTCATGATTCCCATAAGACCCAAAAAATGCGGCGCCTTGTACAATTG 1	50
TAstroV-2_ORF1b_Farm_7	TTCCTTCATGATTCTCATAAGACCCAAAAAATGCGGCGCCTTGTACAATTG 1	50
TAstroV-2_ORF1b_Farm_1	TTCCTTCATGATTCCCATAAGACCCAAAAAATGCGGCGCCTTGTACAATTG 1	50
TAstroV-2_ORF1b_Farm_3	TTCCTCCATGATTCCCATAAGACCTTAAAAATGCGGCGCCTTGTACAATTG 1	50
TAstroV-2_ORF1b_Farm_8	TTCCTCCATGATTCCCATAAGACCTTAAAAATGCGGCGCCTTGTACAATTG 1	50
TAstroV-2_ORF1b_Farm_5	TTCCTTCATGATTCCCATAAGACCCCAAAAATGCGGCGCCTTGTACAATTG 1	50
TAstroV-2_ORF1b_Farm_4	TTCCTTCATGATTCTCATAAAACCCCAAAGATGCGGCGTCTGTACAATTG 1	50
TAstroV-2_ORF1b_GQ301034.1	TTCCTTCATGATTCTCATAAGACCCCAAAGATGCGGCGCTTGTATAATTG 1	50
	**** ******* **** *** *** *** ********	

TAstroV-2_ORF1b_Farm_2 TAstroV-2_ORF1b_Farm_6 TAstroV-2_ORF1b_Farm_7 TAstroV-2_ORF1b_Farm_1 TAstroV-2_ORF1b_Farm_3 TAstroV-2_ORF1b_Farm_8 TAstroV-2_ORF1b_Farm_5 TAstroV-2_ORF1b_Farm_4

GTATGTAAAAAATTTGCTGGAGAAAATCATTTTGTTACCAACCGGAGAGG 200 GTATGTAAAAAATTTGCTGGAGAAAATCATTTTGTTACCAACCGGAGAGG 200 GTATGTAAAAAATTTGCTGGAGAAAATCATTTTGTTACCAACCGGAGAGG 200 GTATGTAAAAAATTTGTTGGAAAAAATTATTTTGTTGCCAACCGGAGAGG 200 GTATGTAAAAAATTTGTTGGAAAAAATTATCCTACTGCCAACTGGGGAGG 200 GTATGTAAAAAATTTGTTGGAAAAAATTATCCTACTGCCAACTGGGGAGG 200 GTATGTAAAAAATTTGTTGGAAAAAATTATCTTACTGCCAACTGGAGAGG 200 GTATGTAAAAAATTTGTTGGAAAAAATCATCTTACTGCCAACTGGAGAAG 200 TAstroV-2_ORF1b_GQ301034.1 GTATGTGAAAAAATCTGTTGGAAAAAATCATCTTACTGCCAACTGGAGAAG 200 ***** ***** ** **** *** ** * * ***** ** *

Anhang

TAstroV-2_ORF1b_Farm_2	TCTGCCAGGTCAAAAAGGGAAATCCGAGTGGTCAATACTCAACAACTGTT	250
TAstroV-2_ORF1b_Farm_6	TCTGCCAGGTCAAAAAGGGAAATCCGAGTGGTCAATACTCAACAACTGTT	250
TAstroV-2_ORF1b_Farm_7	TCTGCCAGGTCAAAAAGGGAAATCCGAGTGGTCAATACTCAACAACTGTT	250
TAstroV-2_ORF1b_Farm_1	TCTGCCAGGTCAAAAAAGGAAATCCGAGTGGTCAATATTCAACAACTGTG	250
TAstroV-2_ORF1b_Farm_3	TCTGTCAGGTTAAGAAAGGAAATCCGAGTGGACAATATTCAACAACTGTG	250
TAstroV-2_ORF1b_Farm_8	TCTGTCAGGTCAAGAAAGGAAATCCGAGTGGACAATATTCAACAACTGTG	250
TAstroV-2_ORF1b_Farm_5	TCTGCCAGGTCAAGAAAGGAAATCCGAGTGGTCAATATTCAACAACTGTG	250
TAstroV-2_ORF1b_Farm_4	TCTGCCAGGTCAAGAAAGGGAATCCAAGTGGTCAATATTCAACAACTGTG	250
TAstroV-2_ORF1b_GQ301034.1	TTTGCCAGGTCAAGAAAGGAAATCCAAGTGGTCAGTATTCAACAACTGTG	250
	* ** **** ** ** ** ** ***** ***** ** **	

TAstroV-2_ORF1b_Farm_2 TAstroV-2_ORF1b_Farm_6 TAstroV-2_ORF1b_Farm_7 TAstroV-2_ORF1b_Farm_1 TAstroV-2_ORF1b_Farm_3 TAstroV-2_ORF1b_Farm_8 TAstroV-2_ORF1b_Farm_5 TAstroV-2_ORF1b_Farm_4

 ${\tt GATAACAACATGATAAATGTCTGGTTAACAACATTTGAAATTTCATATCT \ \ 300$ GATAACAACATGATAAATGTCTGGTTAACAACATTTGAAATTTCATATCT 300 GATAACAATATGATAAATGTCTGGTTAACAACATTTGAAATTTCATATCT 300 GATAACAACATGATAAATGTCTGGTTAACAACATTTGAAATTTCATACCT 300 GATAACAACATGATAAATGTCTGGCTAACAGCGTTTGAAATTTCATACCT 300 GATAACAACATGATAAATGTCTGGCTAACAGCGTTTGAAATTTCATATCT 300 GATAACAACATGATAAATGTCTGGCTAACAACATTTGAAATTTCATACCT 300 GATAACAACATGATCAATGTCTGGCTAACAACATTTGAGGTTTCATACTT 300 $\texttt{TAstroV-2_ORF1b_GQ301034.1} \quad \texttt{GATAATAATAATAATGATCAATGTCTGGCTAACAACATTTGAGGTTTCATACCT 300}$

TAstroV-2_ORF1b_Farm_2	CTTCTTTAAACAGCATGGTAGACTGCCAACAGAGAAAGAGCTGC 3	44
TAstroV-2_ORF1b_Farm_6	CTTCTTTAAACAGCATGGTAGACTGCCAACAGAGAAAGAGCTGC 3	44
TAstroV-2_ORF1b_Farm_7	CTTCTTTAAACAGCATGGTAGACTGCCAACAGAGAAAGAGCTGC 3	44
TAstroV-2_ORF1b_Farm_1	CTTTTTTAAACAGCATGGTAGACTGCCAACAGAGAAAGAGCTGC 3	44
TAstroV-2_ORF1b_Farm_3	CTTTTTTAAACAGTTTGGTAGACTGCCAACAGAGAAAGAGCTGC 3	44
TAstroV-2_ORF1b_Farm_8	CTTTTTTAAACAGTTTGGTAGACTGCCAACAGAGAAAGAGCTGC 3	44
TAstroV-2_ORF1b_Farm_5	CTTTTTTAAACAGCTTGGTAGACTGCCAACAGAGAAAGAGCTGC 3	44
TAstroV-2_ORF1b_Farm_4	GTTTTTTAAACAGCGTGGTAGACTGCCAACAGAGAAAGAGCTGC 3	44
TAstroV-2_ORF1b_GQ301034.1	ATTCTTCAAACAGCGTGGTAGACTGCCAACAGAGAAAGAGCTGC 3	44
	** ** ***** ***************************	

Publikationsverzeichnis

- Akimkin V., M. Hoferer, R. Sting, C. Popp, H.M. Hafez (2010): Detection of enteric viruses in turkey flocks in South Germany using RT-PCR and Transmission electron microscopy (TEM). In: Proceedings of the 8th International Symposium on Turkey Diseases. Berlin. (Ed. H.M. Hafez). Mensch und Buch Verlag - ISBN. 978 3 86664 872 2. pp. 140-144
- Akimkin V., M. Hoferer, R. Sting, C. Popp, H.M. Hafez (2010): Nachweis enteraler Viren in Putenbeständen mittels PCR und Elektronenmikroskopie. 29. Arbeits- und Fortbildungstagung des Arbeitskreises für veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik (AVID) Virologie der DVG, Bad Staffelstein/Kloster Banz
- Akimkin V., M. Hoferer, (2009): Nachweis enteraler Viren in Putenbeständen mittels PCR und Elektronenmikroskopie. Projektvorstellung. 7. Labormeeting des Arbeitskreises Elektronenmikroskopische Erregerdiagnostik (AK-EMED) der Deutschen Gesellschaft für Elektronenmikroskopie, Stuttgart, Germany
- Akimkin, V., F. Bindel, M. Hoferer, R. Sting, B. Polley, A. Hänel, H. M. Hafez (2011): One-step RT-qPCR with an internal control system for the detection of turkey rotaviruses in faecal samples. Journal of Virological Methods 177(1), pp. 112-117

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen voran gilt mein Dank Professor Hafez für die Überlassung dieses interessanten Themas und seine Unterstützung dieser Arbeit sowie für die Möglichkeit eigenständig zu arbeiten und für alle gewährten Freiheiten.

Der Grimminger-Stiftung für Zoonosen-Forschung danke ich für die Bereitstellung der finanziellen Mittel zur Realisierung dieses Projektes.

Mein besonderer Dank richtet sich an Dr. Marc Hoferer für die ausgesprochen kompetente, fachlich fundierte und sehr freundliche und geduldige Betreuung während der Entstehung dieser Arbeit. Vor allem durch seine Hilfsbereitschaft und Zusammenarbeit konnte ich das Projekt zu Ende führen.

Ein herzlicher Dank an Dr. Reinhard Sting für die zahlreichen Hilfestellungen und Anregungen und die stets gute Zusammenarbeit.

Meinen Kollegen Frau Dr. Polley, Frau Dr. Ackermann und Herrn Dr. Hänel möchte ich ebenfalls einen großen Dank für die fachliche Unterstützung, zahlreiche Korrekturen und vor allem für ein sehr gutes Arbeitsklima während der Arbeit aussprechen.

Ich bedanke mich bei der Leiterin des Chemischen und Veterinäruntersuchungsamtes Frau Roth für die Unterstützung und für die Bereitstellung der nötigen Laborkapazitäten zur Umsetzung der Arbeit.

Vielen Dank an Frau Dr. Popp für die Hilfeleistung bei der Auswahl der am Projekt teilnehmenden Putenbetriebe, eine Unterstützung bei der Probennahme und für die wertvollen Informationen aus der tierärztlichen Praxis.

Den Landwirten, die an diesem Projekt teilgenommen haben, bedanke ich mich ganz herzlich.

Für die großzügige Unterstützung bei der Durchführung der wissenschaftlichen Untersuchungen möchte ich mich bei Frau Brauer, Frau Roski und Frau Weibel ganz besonders bedanken.

Ich bedanke mich auch bei Frau Lipp für ihre Hilfe beim Korrekturlesen und die tatkräftige Unterstützung bei der Formatierung des Textes.

Und nicht zuletzt bedanke ich mich von ganzem Herzen bei meiner Frau und meinen Kindern, die mich mit viel Liebe in meiner Arbeit unterstützt und motiviert haben.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Stuttgart, den 17.04.2013

Valerij Akimkin